

Univerzita Karlova

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Genetika, molekulární biologie a virologie



Bc. Kryštof Štafl

Molekulární mechanismy buněčné nepermissivity vůči viru Rousova sarkomu

Molecular mechanisms of cellular nonpermissiveness against Rous sarcoma virus

Diplomová práce

Vedoucí závěrečné práce: prof. RNDr. Jan Svoboda, DrSc.

RNDr. Jiří Hejnar, CSc.

Konzultant: Ing. Anna Lounková

Praha, 2017

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 2. 5. 2017

Podpis

Poděkování

Rád bych na tomto místě poděkoval těm, kteří umožnili vypracování této práce:

- Na prvním místě Aničky Lounkové, za uvedení do problematiky, její ochotu, trpělivost, cenné rady a poskytnuté materiály, jmenovitě primery a RCASBP-EnvC-GFP.
- Dr. Josefu Gerykovi za poskytnutí buněčných kultur, předání cenných rad týkajících se jejich kultivace a za příjemnou společnost při práci s nimi. Děkuji také za poskytnutí virů RCASBP- Δ env-GFP(VSV-G) a RCASBP-EnvC-GFP(VSV-G), imunoadhesinu sTvc-mIgG a literatury týkající se daPR-RSV-C.
- Dr. Marku Federspielovi za poskytnutí vektorů RCASBP-A-GFP a RCASBP-C-GFP naší laboratoři.
- Dr. Walteru Mothesovi za poskytnutí protilátky proti EnvC naší laboratoři.
- Dr. Filipu Šeniglovi za poskytnutí konstruktů pAG3 a pcGagPol.
- Davidu Přikrylovi za poskytnutí primerů a provedení PERT esejí.
- Dr. Voloděovi Stepanetsovi za poskytnutí primerů a DNA daPR-RSV-C.
- Martině Benešové za poskytnutí primerů.
- Lubomíře Pecnové a Daně Kučerové za asistenci při molekulárním klonování.
- Lence Mikušové za odbornou a technickou podporu při práci s buněčnými kulturami.
- Aničky Lounkové, Dr. Kateřině Trejbalové a Dr. Jiřímu Hejnarovi za kritické čtení této práce a její konstruktivní připomínkování, kterému věnovali svůj volný čas.
- Své rodině a kamarádům za všechny druhy podpory, jakých se mi dostává.

Děkuji Dr. Jiřímu Hejnarovi za pomoc v poslední fázi přípravy této práce a také za příjemnou atmosféru v laboratoři virové a buněčné genetiky, kterou jeho vedení umožňuje. Také děkuji celému kolektivu naší laboratoře, že této možnosti plně využívá a dále ji rozvíjí.

Chtěl bych poděkovat svému školiteli, prof. Janu Svobodovi, za umožnění práce pod jeho vedením. Bylo pro mě velkou ctí být součástí týmu, který má v čele tak silnou a inspirující osobnost.

Tento projekt byl podpořen Grantovou agenturou České republiky prostřednictvím grantu GA15-22207S.

Abstrakt

Většina virů dokáže infikovat pouze omezené spektrum organismů a jen v některých z nich je možná jejich účinná replikace. Takové organismy označujeme jako permissivní pro daný virus. Molekulární podstata nepermissivity a mechanismy, kterými ji viry dokážou překonat, zatím nejsou dostatečně prostudovány.

Tato práce zkoumá molekulární příčiny buněčné nepermissivity vůči viru Rousova sarkomu, který je modelovým retrovirem. Výzkum je prováděn na kachních buňkách, které jsou vůči viru Rousova sarkomu podskupiny C semipermissivní, což znamená, že virus do nich dokáže vstoupit, ale nevytváří dostatečné množství infekčního virového potomstva.

Výsledky této práce ukazují dva bloky v replikačním cyklu viru v kachních buňkách. První je na úrovni rozpoznání receptoru, které zřejmě není optimální. Druhý blok se nachází v pozdní fázi replikačního cyklu při syntéze virových proteinů. Předloha pro obalový glykoprotein, *env* mRNA, nevzniká kvůli pozměněným sestrňhovým poměrům v dostatečném množství a produkováné viriony z kachních buněk mají sníženou infektivitu. Tento blok může být částečně překonán buněčnou fúzí s permissivními kuřecími buňkami, je tedy recesivní a nejedná se zde o *sensu stricto* specifické restriční faktory.

Dále byl testován vliv mutací získaných při adaptaci viru na kachní buňky. Oproti předpokladům nehrají mutace v obalovém glykoproteinu zásadní roli na efektivitu replikace v kachních buňkách.

Klíčová slova: adaptace, buněčná fúze, cizodruhový hostitel, heterotransmise, kachna, permissivita, RCAS, replikační cyklus, retrovirus, RSV, sestrňh mRNA, virus Rousova sarkomu.

Abstract

Most viruses can infect only a reduced range of organisms and an effective replication is possible only in selected hosts. These hosts are called permissive for the virus. Molecular principles of a nonpermissiveness and viral mechanisms of overcoming replication obstacles are still not clearly elucidated.

This thesis discusses the molecular causes of the cellular nonpermissiveness against a model retrovirus – Rous sarcoma virus. The research is conducted on duck cells which are semipermissive to the subgroup C of Rous sarcoma virus. The virus can enter those cells, but it is not able to produce enough infectious viral progeny.

Two blocks of the viral replication cycle in the duck cells are described in the thesis. The first one is the probably not optimal cellular receptor recognition. The second one is in the late phase of the replication cycle when the viral proteins are synthesized. The amount of the envelope glycoprotein coding mRNA is reduced due to the altered splicing ratios, and the virions produced from the duck cells are less infectious. This block is recessive and can be partially omitted by cell fusions with permissive chicken cells; therefore, the block is not caused by specific restriction factors in *sensu stricto*.

Additionally, the influence of mutations in duck adapted Rous sarcoma virus was studied. Acquired mutations in envelope glycoprotein do not have the expected effect on the virus replication in the duck cells.

Keywords: adaptation, cell fusion, duck, heterologous host, heterotransmission, mRNA splicing, permissiveness, RCAS, replication cycle, retrovirus, Rous sarcoma virus, RSV.

Obsah

1. Úvod	17
2. Literární přehled	19
2.1 Retroviry	19
2.2 Virus Rousova sarkomu	20
2.3 Patologie	22
2.4 Hostitelská specifita	23
2.5 Výzkum kachen v souvislosti s RSV	24
2.6 Replikační cyklus RSV	25
2.6.1 Vstup do hostitelské buňky	26
2.6.2 Reverzní transkripce a integrace	26
2.6.3 Transkripce proviru	27
2.6.4 Regulace exprese virových proteinů	28
2.6.5 Gag – proteiny kapsidy	30
2.6.6 Pol – enzymy časně fáze	30
2.6.7 Env – obalový glykoprotein	31
2.6.8 v-Src – nestrukturní onkoprotein	32
2.6.9 gRNA – virový genom	32
2.6.10 Skládání virionů	32
2.7 Defekty replikace v cizodruhovém hostiteli	32
3. Cíle práce	35
4. Materiály a metody	37
4.1 Materiály	37
4.1.1 Bakteriální kmeny a jejich kultivace	37
4.1.2 Buněčné kultury a jejich kultivace a uchování	37
4.1.3 Víry a vektory	38
4.1.4 Primery	39
4.1.5 Roztoky používané při práci s buněčnými kulturami	40
4.2 Metody	41
4.2.1 Zásady práce s buněčnými kulturami	41
4.2.2 Pasážování buněk	41
4.2.3 Vysévání buněk	41
4.2.4 Skladování buněk	42
4.2.5 PERT	42
4.2.6 PCR s OneTaq polymerázou	42
4.2.7 PCR detekce endogenních retrovirových sekvencí	42
4.2.8 PCR s Phusion polymerázou	42
4.2.9 Agarózová elektroforéza a izolace fragmentů DNA z gelu	43
4.2.10 Měření koncentrace nukleových kyselin	43
4.2.11 Sekvenování	43
4.2.12 Molekulární klonování do pGEM	43
4.2.13 Transformace bakterií	44
4.2.14 Molekulární klonování do RCAS	44

4.2.15	Transfekce buněk	45
4.2.16	Infekce buněk	45
4.2.17	Izolace RNA a příprava cDNA	45
4.2.18	Kvantitativní PCR (qPCR) a analýza výsledků	46
4.2.19	Izolace chromozomální DNA	46
4.2.20	Příprava buněčných lyzátů pro PCR	47
4.2.21	Fluorescenční mikroskopie	47
4.2.22	Průtoková cytometrie a analýza výsledků, přepočet na množství viru	47
4.2.23	Zastavení buněčného dělení	48
4.2.24	Buněčné fúze	48
4.2.25	Software	49
5.	Výsledky	51
5.1	Blok na úrovni vstupu do buněk	51
5.2	Blok virové replikace během pozdní fáze infekce	53
5.3	Aberantní zastoupení sestříhových forem v kachních buňkách	54
5.4	Chybějící hostitelský faktor	56
5.5	Podstata adaptace daPR-RSV-C na nového hostitele	58
5.5.1	RCASBP-daGag-EnvC-GFP	60
5.5.2	RCASBP-daEnv-GFP	61
5.5.3	RCASBP-daEnv(C)-GFP	61
5.6	Vznik transformačně defektních mutant RSV v kachních buňkách	63
6.	Diskuze	65
7.	Souhrn	71
8.	Seznam použité literatury	73

Použité zkratky a jejich původ

ALV	virus ptačí leukózy	<u>a</u> vian <u>l</u> eukosis <u>v</u> irus
AMV	virus ptačí myeloblastózy	<u>a</u> vian <u>m</u> yeloblastosis <u>v</u> irus
ASLV	skupina virů ptačího sarkomu a leukózy	<u>a</u> vian <u>s</u> arcoma and <u>l</u> eukosis <u>v</u> iruses
BH-RSV	Bryanův vysokotitrový kmen RSV	<u>B</u> ryan <u>h</u> igh-titer strain of <u>R</u> SV
BLEF	kuřecí embryonální fibroblasty	<u>b</u> rown <u>l</u> eghorn <u>e</u> mbryo <u>f</u> ibroblasts
<i>BTN1A1</i>	jiný název pro <i>tv</i>	<u>b</u> utyrophilin, subfamily <u>1</u> , member <u>A1</u>
CA	virový kapsidový protein	<u>c</u> apsid protein
cccDNA	kovalentně uzavřená kruhová DNA	<u>c</u> ovalently <u>c</u> losed <u>c</u> ircular <u>D</u> NA
cDNA	DNA kopie RNA	<u>c</u> opy <u>D</u> NA
CEF	kuřecí embryonální fibroblasty	<u>c</u> hicken <u>e</u> mbryo <u>f</u> ibroblasts
c-Src; <i>c-src</i>	buněčná protein-tyrosin kináza, protoonkogen; její gen	<u>c</u> ellular <u>s</u> arcoma kinase
da	kachnám adaptovaný	<u>d</u> uck <u>a</u> dapted
DEF	kachní embryonální fibroblasty	<u>d</u> uck <u>e</u> mbryo <u>f</u> ibroblasts
DF-1	kuřecí fibroblastová linie	<u>D</u> F-1 chicken fibroblast cell line
DNA	deoxyribonukleová kyselina	<u>d</u> eoxyribo <u>n</u> ucleic <u>a</u> cid
dNTP	deoxyribonukleotidtrifosfát	<u>d</u> eoxyribo <u>n</u> ucleotide <u>t</u> riphosphates
DR	přímé repetice	<u>d</u> irect <u>r</u> epeats
<i>egfp</i>	gen kódující GFP	<u>e</u> nhanced <u>G</u> FP
Env; <i>env</i>	virový obalový glykoprotein; jeho gen	<u>e</u> nvelope glycoprotein
ESE	exonový sestřihový enhancer	<u>e</u> xonic <u>s</u> plicing <u>e</u> lement
<i>et al.</i>	a kolektiv	<i><u>e</u>t <u>a</u>lii</i>
Gag; <i>gag</i>	virový kapsidový prekurzor; jeho gen	group-specific <u>a</u> ntigen
<i>GAPDH</i>	housekeeping gen kódující glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenázu	glyceraldehyde 3- <u>p</u> hosphate <u>d</u> ehydrogenase
GFP	zelený fluorescenční protein	<u>g</u> reen <u>f</u> luorescent <u>p</u> rotein
gRNA	virová genomová RNA	genomic <u>R</u> NA
HIV	virus lidské imunodeficiency	<u>h</u> uman <u>i</u> mmunodeficiency <u>v</u> irus
H-20	křeččí nádorová linie	Syrian <u>h</u> amster tumor cell line transformed by PR-RSV
ICTV	mezinárodní komise pro virovou taxonomii	<u>I</u> nternational <u>c</u> ommittee on <u>t</u> axonomy of <u>v</u> iruses
IgC	imunoglobulinová konstantní doména	<u>i</u> mmunoglobulin <u>c</u> onstant domain

IgG	imunoglobulin třídy G	immunoglobulin <u>G</u>
IgV	imunoglobulinová variabilní doména	immunoglobulin <u>v</u> ariable domain
IN	virová integráza	<u>i</u> ntegrase
<i>in vitro</i>	ve skle, v Petriho misce	
<i>in vivo</i>	v živém, v organismu	
K 7-7	kachní fibroblastová linie	
LTR	dlouhé koncové repetice	long terminal <u>r</u> epeats
MA	virový matrixový protein	<u>m</u> atrix protein
MAV	helper virus pro AMV	<u>m</u> yeloblastosis- <u>a</u> ssociated <u>v</u> irus
mRNA	RNA sloužící jako předloha pro translaci	<u>m</u> essenger <u>R</u> NA
NC	virový nukleokapsidový protein	<u>n</u> ucleo <u>c</u> apsid protein
NRS	negativní regulátor sestřihu	<u>n</u> egative <u>r</u> egulator of <u>s</u> plicing
PBS	vazebné místo pro primer fosfátem pufovaná sůl	<u>p</u> rimers <u>b</u> inding <u>s</u> ite <u>p</u> hosphate- <u>b</u> uffered <u>s</u> aline
PCR	polymerázová řetězová reakce	<u>p</u> olymerase <u>c</u> hain <u>r</u> eaction
PEG	polyethylenglykol	<u>p</u> oly <u>e</u> thylene glycol
PERT	esej pro měření reverzní transkriptázy	<u>p</u> roduct- <u>e</u> nhanced <u>r</u> everse transcriptase
Pol, <i>pol</i>	prekurzor virové reverzní transkriptázy; její gen	<u>p</u> olymerase
PR	virová proteáza	<u>p</u> rotease
PR-RSV	Pražský kmen RSV	<u>P</u> rague strain of <u>R</u> SV
ψ	enkapsidační signál	encapsidation signal
qPCR	kvantitativní PCR	<u>q</u> uantitative <u>P</u> CR
RAV	helper virus pro RSV	<u>R</u> ous- <u>a</u> ssociated <u>v</u> irus
RCAS	alfaretrovirový vektorový systém	<u>r</u> eplication- <u>c</u> ompetent <u>A</u> SLV LTR with a <u>s</u> plice acceptor
RCASBP	RCAS s polymerázou z BH-RSV	<u>R</u> CAS with <u>B</u> ryan <u>p</u> olymerase
<i>rd</i>	replikačně defektní	<u>r</u> eplication- <u>d</u> efective
REV	retikuloendoteliózní virus	<u>r</u> eticulo <u>e</u> ndotheliosis <u>v</u> irus
RNA	ribonukleová kyselina	<u>r</u> ibo <u>n</u> ucleic <u>a</u> cid
RSCh	křeččí nádorová linie	Chinese hamster tumor cell line trasnformed by SR-RSV
RSV	virus Rousova sarkomu	<u>R</u> ous <u>s</u> arcoma <u>v</u> irus
RT	virová reverzní transkriptáza pokojová teplota	<u>r</u> everse <u>t</u> ranscriptase <u>r</u> oom <u>t</u> emperature

SDS	dodecylsírán sodný	<u>s</u> odium <u>d</u> odecyl <u>s</u> ulfate
SR-SRV	Schmidt-Ruppinův kmen RSV	<u>S</u> chmidt- <u>R</u> uppin strain of <u>RSV</u>
SSS	supresor sestřihu	v- <u>sr</u> <u>s</u> uppressor of <u>s</u> plicing
SU	povrchová podjednotka Env	<u>s</u> urface subunit
<i>td</i>	transformačně defektní	<u>t</u> ransformation- <u>d</u> efective
TM	transmembránová podjednotka Env	<u>t</u> rans <u>m</u> embrane subunit
tRNA	transferová RNA	<u>t</u> ransfer <u>RNA</u>
T _{vc} ; <i>tv</i>	buněčný receptor pro ASLV podskupiny C; jeho gen	tumor <u>v</u> irus <u>C</u> receptor
ÚMG	Ústav <u>m</u> olekulární genetiky Akademie věd České republiky	
v- <i>myb</i>	virový onkogen kódující transkripční faktor	<u>v</u> iral oncogene associated with <u>m</u> yelob <u>l</u> astosis
v-Src; v- <i>src</i>	virová protein-tyrosin kináza, onkoprotein; její gen	<u>v</u> iral <u>s</u> ar <u>c</u> oma kinase
VSV-G	povrchový glykoprotein viru vezikulární stomatitidy	<u>v</u> esicular <u>s</u> tomatitis <u>v</u> irus <u>G</u> protein
XC	krysí nádorová linie	rat sarcoma cell line transformed by PR-RSV-C

1. Úvod

Virus Rousova sarkomu (RSV) je jednoduchý retrovirus, který ve svém genomu kóduje kromě strukturních genů také onkogen *v-src*. Byl objeven před více než sto lety a dodnes patří mezi nejstudovanější zástupce retrovirů. Jeho přirozeným hostitelem je kur domácí, dokáže však s různou účinností infikovat i jiné organizmy. Byla provedena řada experimentů popisujících chování viru v savčích buňkách, do kterých virus může v laboratorních podmínkách vstoupit a integrovat se. Příčiny, proč se virus v savčích buňkách nereplikuje, byly hledány jak na straně viru, tak na straně hostitele. Postupně byla objevena řada restričních faktorů, které účinně brání produktivní infekci, i mutace ve virovém genomu, které umožňují zmírnění či překonání některých defektů replikace v cizodruhovém hostiteli.

Přestože jsou savčí buňky našemu druhu bližší, jako model pro studování příčin omezené replikace v cizím hostiteli se zcela nehodí. Bloky ve virové replikaci jsou příliš silné a není jednoduché viru pomoci v jejich překonání. Pro studium je vhodnější, pokud se virus alespoň v omezené míře replikuje a je tak možné kvantifikovat sebemenší experimentálně vyvolanou změnu. Navíc je virus schopen rychlé adaptace na nového hostitele, čímž pomáhá nasměrovat výzkum, protože akumuluje mutace v oblastech, které jsou zodpovědné za sníženou replikaci.

Ideálním modelem, který se nachází právě na pomezí permisivity (virus je schopen účinné replikace) a nepermisivity (virová replikace je účinně blokována), se ukázala být domácí kachna. Její buňky jsou citlivé pouze na RSV podskupiny C a množství produkovaného infekčního potomstva je nižší zhruba o 2 řády oproti virové produkci v permisivním hostiteli.

Tato práce potvrzuje pozorovaný defekt v kachních buňkách a rozšiřuje naše poznání o další podrobnosti ohledně jeho síly, lokalizace a možnostech jeho překonání. Také charakterizuje povahu tohoto defektu pomocí buněčných fúzí a snaží se najít oblast virového genomu, která je zodpovědná za adaptaci viru na kachní buňky.

2. Literární přehled

2.1 Retroviry

Viry jsou submikroskopické infekční částice, které rozšiřují svoji genetickou informaci na úkor ostatních organismů. Jejich poměrně malý genom je nabitý informací nutnou pro zajištění co nejefektivnějšího množení a co nejsilnějšího zastoupení v nám známém světě. K tomu viry využívají různých strategií, některé se rychle šíří a často mění hostitele, jiné jsou skryté a promořují populaci pomalu. Jsou i takové, které poskytují svému hostiteli evoluční výhodu a stávají se esenciální podmínkou jeho života – byť za to platí ztrátou svojí infekitivity.

Retrovirům není cizí ani jedna z těchto strategií, dokonce dokážou využívat jejich kombinací. Jedná se o evolučně velmi staré viry, jejichž předchůdce nalezneme už u kvasinek v podobě Ty retroelementů (Adams *et al.* 1987). Retrovirový genom tvoří dvě molekuly jednořetězcové gRNA pozitivní orientace, které jsou po vstupu do hostitelské buňky pomocí virem kódované reverzní transkriptázy přítomné ve virionech přepisovány do dvouřetězcové cDNA. Ta je následně integrována do buněčného genomu ve formě stabilního proviru, který buňka předává do svého potomstva (Svoboda *et al.* 1963, citováno podle Svoboda 2003). Z proviru jsou buněčným aparátem exprimovány virové strukturní i nestrukturní proteiny, jakož i gRNA, která je balena do virové kapsidy tvořené polyproteiny Gag a Pol. Viriony získávají fosfolipidový obal při pučení z buňky, které probíhá v místech, kde je na vnějším povrchu vystaven virový obalový glykoprotein Env. Částice opouštějící buňku jsou kompletní, ale nejsou ještě infekční, aby nedocházelo k opakované infekci již napadené buňky. Musí dojít k jejich maturaci, kterou zprostředkovává virová proteáza naštěpením proteinových prekurzorů na funkční proteiny.

Zmíněné strukturní proteiny jsou kódované stejnojmennými geny – *gag*, *pol* a *env*. Kromě jednoduchých retrovirů, kterým tyto tři geny v replikačním cyklu stačí, existují také retroviry složité, kódující navíc nestrukturní přídatné (accessory) geny. Tyto geny regulují transkripci proviru, sestřih virových mRNA, umožňují export gRNA z jádra nebo modulují odpověď imunitního systému. Některé retroviry mají ve svém genomu i onkogen, pomocí kterého transformují buňky a zvyšují tak účinnost svého replikačního cyklu.

Komplexita genomů, morfologická podobnost, hostitelská specifita, ale zejména sekvenční homologie umožnily členění čeledi *Retroviridae* do sedmi rodů (tabulka 1).

Tabulka 1 | Taxonomické členění čeledi Retroviridae. Upraveno podle Vogt 1997 s využitím databáze ICTV 2016.

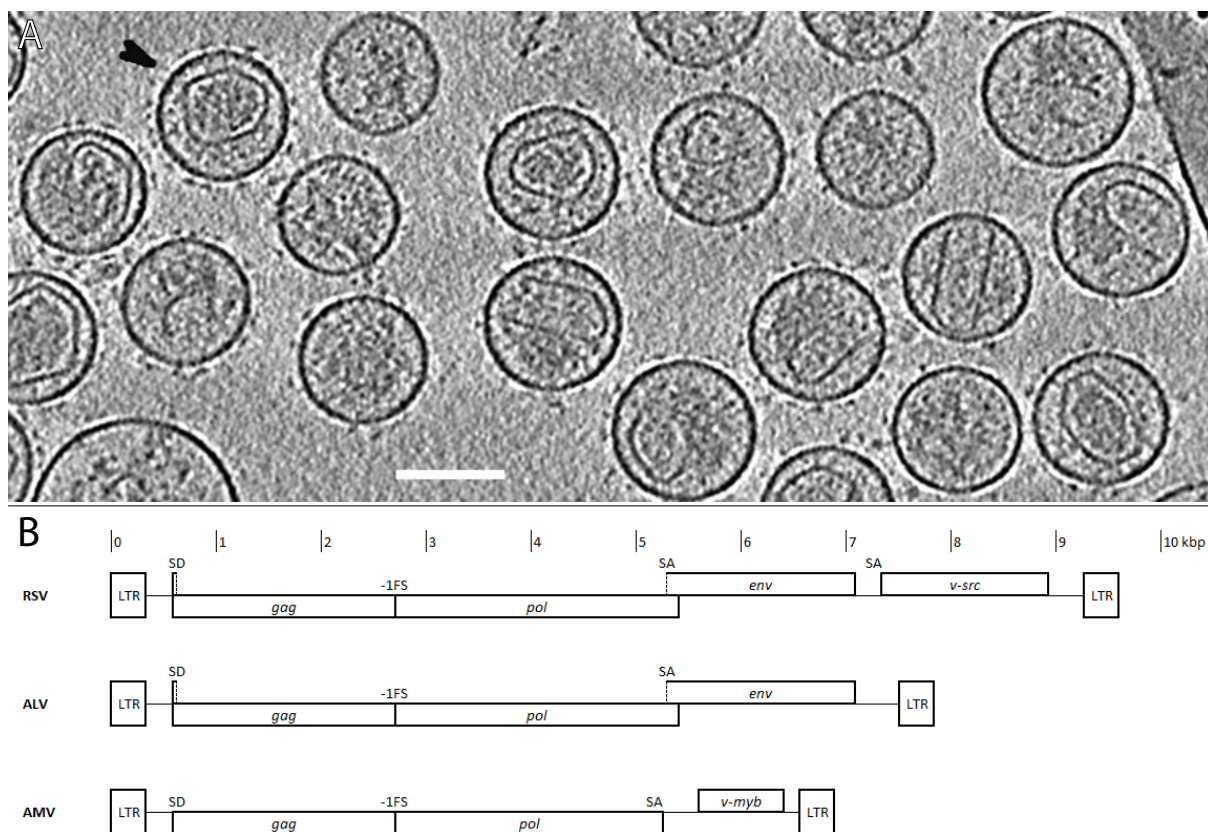
Podčeleď	Rod	Genom	Zástupce
Orthoretrovirinae	<i>Alpharetrovirus</i>	jednoduchý	virus ptačí leukózy, virus Rousova sarkomu
	<i>Betaretrovirus</i>	jednoduchý	<i>mouse mammary tumor virus</i>
	<i>Gammaretrovirus</i>	jednoduchý	<i>murine leukemia virus</i> , retikuloendoteliózní virus
	<i>Deltaretrovirus</i>	komplexní	<i>bovine leukemia virus</i>
	<i>Epsilonretrovirus</i>	jednoduchý	<i>walleye dermal sarcoma virus</i>
	<i>Lentivirus</i>	komplexní	virus lidské imunodeficiency 1
Spumaretrovirinae	<i>Spumavirus</i>	komplexní	<i>simian foamy virus</i>

2.2 Virus Rousova sarkomu

Virus Rousova sarkomu (Rous sarcoma virus, RSV; obr. 1A) je řazen do rodu *Alpharetrovirus* (ICTV 2016). Maturované viriony jsou morfologie C s průměrem zhruba 125 nm (Kingston *et al.* 2001). Přírodním hostitelem RSV je kur domácí (*Gallus gallus domesticus*), ve kterém transformuje infikované buňky v rakovinné pomocí nestrukturního onkoproteinu v-Src, který kóduje ve svém genomu. Právě kuřecí sarkom byl v roce 1910 popsán jako první přenosná ptačí neoplázie; o rok později Peyton Rous zjistil, že k přenosu stačí bezbuněčný filtrát (Rous 1910; Rous 1911).

RSV patří do skupiny virů ptačího sarkomu a leukózy (avian sarcoma and leukosis viruses, ASLV), která sdružuje blízké příbuzné kmeny. Od viru ptačí leukózy (avian leukosis virus, ALV) se liší přítomností onkogenu; ostatní viry této skupiny nesoucí onkogen zase nejsou schopny samostatné replikace (jsou replikačně defektní, *rd*), neboť onkogen nahrazuje některý z genů kódujících strukturní proteiny (obr. 1B). Takové viry potřebují ke své replikaci komplementaci tzv. pomocným virem (helper virus), který doplní chybějící či defektní strukturní gen. Izoláty *rd* virů běžně tyto pomocné viry obsahují; např. virus ptačí myeloblastózy (avian myeloblastosis virus, AMV) byl izolován společně s virem s myeloblastózou asociovaným (myeloblastosis-associated virus, MAV).

Kuřecí genom obsahuje také množství pozůstatků po předchozích infekcích ASLV, neboť pokud je infikována buňka v zárodečné linii, může se virový genom přenést do dalších generací ve formě proviru. Lokusy obsahující endogenní proviry jsou u kuřat označeny jako *ev*; většinou nejsou exprimovány a nevznikají z nich exogenní (infekční) viriony. Pokud k expresi dochází, mohou být



Obrázek 1 | Struktura viru Rousova sarkomu.

A | Elektronmikroskopický snímek řezu viriony PR-RSV-C. Měřítko 100 nm. Převzato z Butan *et al.* 2008.

B | Srovnání genomů ASLV. RSV je jediný akutně onkogenní a zároveň replikačně kompetentní zástupce skupiny. ALV (stejně jako transformačně defektní mutanty RSV) ve svém genomu nemá onkogen, AMV (stejně jako *rd* RSV) nemá všechny strukturní geny a ke své replikaci vyžaduje helper virus. Všechny viry využívají ribozomální posun čtecího rámce (–1FS) pro syntézu Gag-Pol polyproteinu; mRNA pro obalový glykoprotein a onkogen musí být sestřižena mezi sestřihovým donorem (SD) a akceptorem (SA). Před genem *v-myb* má navíc AMV samostatný promotor (Rushlow *et al.* 1982). S využitím záznamů v databázi GenBank: J02342.1 (RSV), Z46390.1 (ALV), J02013 (AMV).

takoví jedinci rezistentní vůči exogenním retrovirům, Env endogenního původu dokáže obsadit vazebná místa buněčných receptorů.

V buňce infikované více viry (i ve formě endogenních provirů) může docházet k rekombinaci virových genomů. Tento jev je sice nepravděpodobný, ale byl pozorován (Weiss *et al.* 1973). Biologicky nejdůležitější je záměna *env*, jejímž důsledkem není možné zařadit izolát do druhu podle sekvence *env* – naopak izoláty různých druhů ASLV se stejným *env* řadíme do podskupin A–E, J a K. Podskupiny F–I se vyskytují u divokých kurovitých ptáků v endogenní formě. Pro každou podskupinu je specifický buněčný receptor, jehož přítomnost definuje susceptibilní buňky. Proto je nutné u každého izolátu uvádět nejen druh viru, ale i podskupinu *env*, která často napoví více o chování viru.

2.3 Patologie

Viry skupiny ASLV jsou jedním ze třech nejčastějších virových původců nádorového bujení v drůbežích chovech (shrnutí v Fadly *et al.* 2008). Začátkem 60. let byla leukóza častým důvodem pro utracení – až třetina z utracené drůbeže byla usmrcena právě kvůli leukóze (Benton *et al.* 1962). ASLV patří spolu s dalším původcem, retikuloendoteliózním virem (reticuloendotheliosis virus, REV), mezi retroviry. Není proti nim k dispozici komerční vakcína, probíhají ale poměrně úspěšné eradikační programy, založené na PCR diagnostice, geneticky rezistentních jedincích a karanténních opatřeních (Fadly *et al.* 2008). Bohužel, patologické projevy těchto virů jsou zaměnitelné a nejsou vedeny rozsáhlejší statistiky o původcích nádorových onemocnění drůbeže.

ASLV, jak už název skupiny napovídá, způsobují sarkomy a leukózy, zejména lymfopoetického systému. Méně časté jsou erytroblastózy, myeloblastózy, myelocytomatózy (zejm. podsk. J), nefroblastomy a osteopetrózy (tabulka 2). Vyvolané onemocnění závisí nejen na podskupině, do které daný kmen patří, ale také na dávce viru, které je organismus vystaven, místě infekce, čistotě izolátu, jakož i věku, pohlaví a genetické výbavě hostitele. Virus rychle mutuje a po několika pasážích *in vitro* se přizpůsobí buňkám, na kterých je pěstován.

Kmeny ASLV se dělí mezi akutně a chronicky transformující viry, v závislosti na tom, zda ve svém genomu kódují, resp. nekódují onkogen. Akutně transformující viry (např. RSV) jsou schopny indukovat rakovinné bujení v řádu dnů či týdnů. Vzniklé akutní leukózy či sarkomy jsou polyklonálního původu. Chronicky transformující viry (např. ALV, RAV) vyvolávají rakovinu samotnou integrací proviru do hostitelského genomu, jejich silné promotory v LTR (dlouhé koncové repetice, long terminal repeats) oblastech dokáží deregulovat expresi protoonkogenu, pokud je poblíž. Populace transformovaných buněk má potom společného předka, všechny buňky mají provirus integrovaný na stejném místě.

Virus se šíří horizontálně, kongenitálně a ve formě proviru v zárodečné linii. Viriony nejsou mimo hostitele dlouho stabilní, horizontální přenos je zprostředkován přímým (sexuálním) kontaktem, případně přes trus a sliny u mladých jedinců. Vertikální kongenitální přenos z matky na vejce udržuje virus v populaci a endogenní formy virů předávané v genomu do potomstva vytvářejí jakýsi rezervoár, který má potenciál uvolnit infekční virus v dalších generacích a v populacích, ve kterých se exogenní forma nevyskytuje (shrnutí v Payne 1987). Nicméně samotný vertikální přenos pro udržení infekčního viru v populaci nestačí (Payne & Bumstead 1982).

Tabulka 2 | Laboratorní kmeny ASLV podle podskupin a nejčastěji způsobené neoplázie. Podle Fadly *et al.* 2008, upraveno s využitím N. Cui *et al.* 2014.

Klasifikace virů podle vyvolávané neoplázie	Klasifikace ASLV podle obalového glykoproteinu							ΔEnv
	A	B	C	D	E	J	K	
virus lymfoidní leukózy (LLV)	RAV-1 RIF-1 MAV-1 RPL12 HPRS-F42	RAV-2 RAV-6 MAV-2	RAV-7 RAV-49	RAV-50 CZAV	RAV-60	–	–	–
virus ptačí erytroblastózy (AEV)	–	–	–	–	–	–	–	AEV-ES4 AEV-R AEV-H
virus ptačí myeloblastózy (AMV)	–	–	–	–	–	–	–	AMV-BAI-A
virus ptačího sarkomu (ASV)	SR-RSV-A PR-RSV-A EH-RSV RSV29	SR-RSV-B PR-RSV-B HA-RSV	B77 PR-RSV-C	SR-RSV-D CZ-RSV	SR-RSV-E PR-RSV-E	–	–	BH-RSV BS-RSV FuSV PRCII, PRCIV ESV Y73 UR1, UR2 S1
viry myelocytomatózy a endoteliomatózy	–	–	–	–	–	HPRS-103 ADOL-Hc1	–	MC29 MH2 CMII OK10
endogenní virus (EV) bez neoplázií	–	–	–	–	EV21 ILV	–	JS11C1	RAV-0

2.4 Hostitelská specifita

Víry se neomezuji pouze na svého přirozeného hostitele, pokud je infikován jiný druh, snaží se mu virus přizpůsobit a dokončit replikační cyklus v něm. Podle odolnosti vůči virové infekci rozlišujeme hostitelské buňky na *susceptibilní* (vnímavé, virus dokáže do buňky vstoupit) a *rezistentní* (odolné, virus nedokáže takové buňky infikovat). Pokud je virus schopen buňku infikovat a tato buňka produkuje dostatečné množství potomstva, je pro virus *permisivní*, pokud infikovaná buňka virus neprodukuje, je *nepermisivní*. Ani jedno z těchto dělení není striktní, některé buňky jsou vnímavé málo (*semirezistentní*), v některých je virus schopen se množit, avšak s malou efektivitou (*semipermisivní* buňky).

Přirozeným hostitelem RSV je kur domácí (*Gallus gallus*), s různou účinností ale dokáže infikovat i jiné druhy ptáků (tabulka 3), jeho provirus byl detekován i v nádorových buňkách savců, kteří byli experimentálně infikováni kuřecí nádorovou suspenzí (Svoboda 1960; Varmus, Bishop, *et al.* 1973). V savčích buňkách se ale virus nedokáže replikovat a není produkováno infekční potom-

stvo (shrnutí v Svoboda 2003). Pokud k replikaci v cizodruhovém hostiteli dochází, začínají v jeho populaci rychle převládat mutanty, které zjednodušují replikační cyklus, byť za cenu nižší infekitivity a stability vznikajících virionů. Virus také často ztrácí svůj onkogen (vznikají transformačně defektní (*td*) varianty) a akumuluje mutace zejména v obalovém glykoproteinu *env*, který je zodpovědný za hostitelskou specifitu viru (Vogt 1971; Hu *et al.* 1978).

Tabulka 3 | Citlivost vybraných druhů drůbeže vůči podskupinám ASLV. S, susceptibilní; R, rezistentní; SR, semirezistentní; R/S, v populaci jsou susceptibilní i rezistentní jedinci. Podle Weiss 1993; upraveno s využitím Vogt 1977; Payne *et al.* 1992; N. Cui *et al.* 2014; Avibase 2017.

	Klasifikace ASLV podle obalového glykoproteinu					
	A	B	C	D	E	J
Allela kódující receptor	<i>tv^a</i>	<i>tvb^{S1}, tvb^{S3}</i>	<i>tv^c</i>	<i>tvb^{S1}, tvb^{S3}</i>	<i>tvb^{S1}, tvb^T</i>	<i>tv^j</i>
nadřád: drůbež (Galloanserae)						
řád: hrabaví (Galliformes)						
čeleď: bažantovití (Phasianidae)						
bažant obecný (<i>Phasianus colchicus</i>)	S	R	SR	R/S	S	R
kur Sonneratův (<i>Gallus sonneratii</i>)	S	S	S	S	S	S
kur domácí (<i>Gallus gallus</i>)	R/S	R/S	R/S	R/S	R/S	S
řád: vrubozobí (Anseriformes)						
čeleď: kachnovití (Anatidae)						
husa velká (<i>Anser anser</i>)	R	R	S	R	R	R
kachna divoká (<i>Anas platyrhynchos</i>)	R	R	S	R	R	R

2.5 Výzkum kachen v souvislosti s RSV

Kachna divoká (*Anas platyrhynchos*) patří do jiného řádu než kuře, jejich společný předek žil před 70–100 miliony let (Haddrath & Baker 2001). Jak je zřejmé z tabulky 3, kachny jsou susceptibilní jediné vůči ASLV podskupiny C a v této souvislosti jsou studovány již dlouho (Murphy & Rous 1912). Původně se předpokládalo, že v kachním genomu nejsou proviry příbuzné RSV (Varmus, Vogt, *et al.* 1973; Shoyab & Baluda 1975), nicméně po osekvevnování kachního genomu v něm bylo nalezeno 7 sekvencí příbuzných alfaretrovirům (Huang *et al.* 2013; J. Cui *et al.* 2014).

Pro indukci neoplázií je nutné infikovat kachní embrya či velmi mladé (v řádu hodin) jedince nádorovou suspenzí (Purdy 1932). Dospělí jedinci jsou vůči projevům viru rezistentní. Aplikace bezbuněčného filtrátu je mnohem méně účinná (65 vs. 22 %) a jsou potřeba vyšší dávky viru. Navíc kachny infikované filtrátem vyvíjejí spíše hemoragická onemocnění než sarkomy (Duran-

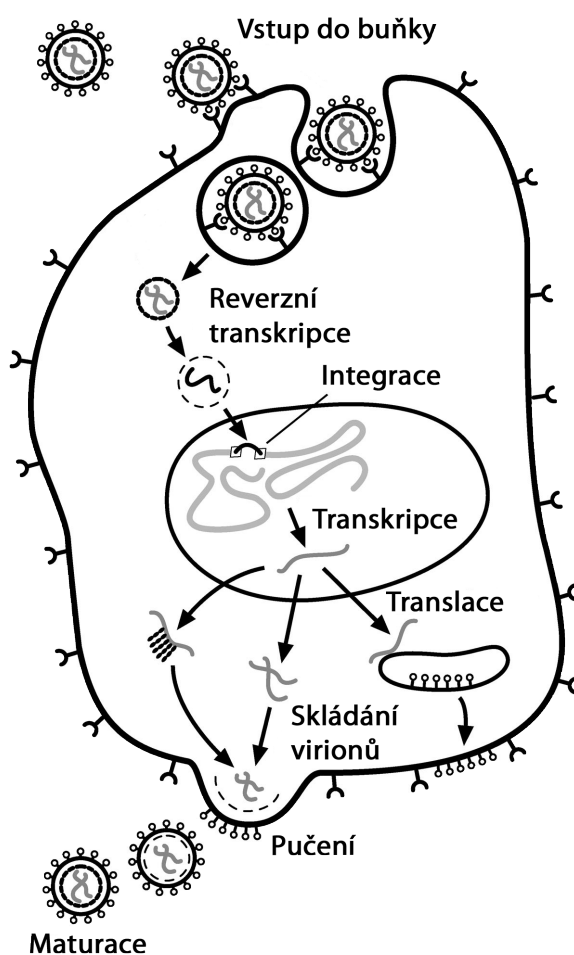
-Reynals 1942). Pokud jsou kachny během embryogeneze infikovány *td PR-RSV-C*, navozuje virus dlouhodobou perzistenci (Svoboda *et al.* 1980).

Odlíšné prostředí nutí virus, aby se přizpůsobil a našel si tak cestu ke své replikaci. Virus adaptovaný na kachny (daPR-RSV-C) byl po několika pasážích v kachních embryonálních fibroblastech (DEF) skutečně izolován, replikuje se v nich stejně efektivně, jako v kuřecích embryonálních fibroblastech (BLEF), není transformačně defektní (Hložánek *et al.* 1979). Obsahuje tři nukleotidové mutace v LTR, 4 konzervativní a 7 nekonzervativních aminokyselinových záměn v Gag, 1 konzervativní a 4 nekonzervativní záměny v Pol, 7 konzervativních a 7 nekonzervativních v Env a 3 konzervativní a 4 nekonzervativní ve v-Src. Nejvíce mutací je v kapsidovém proteinu (CA) a v povrchové podjednotce (SU) Env (Schwartz *et al.* 1983; Kashuba *et al.* 1993).

daPR-RSV-C byl získán cíleně v podmínkách *in vitro*. Spolu s tímto izolátem mutoval původní virus do formy *td* mutant, které jsou v cizím hostiteli zvýhodněné, neboť je jejich genom kratší a obsahuje pouze jeden sestříhový akceptor. Kvůli absenci onkogenu ale *td* viry netvoří *foci* a nemohou být (pokud buňky neobsahují RSV(Δ Env) proviry; Murphy 1977) detekované fokální esejí. Zvolený postup zřejmě značně urychlil evoluční procesy a umožnil vznik nedefektního viru, který v kachnách není znevýhodněn a *in vitro* dokáže transformovat kachní a kuřecí embryonální fibroblasty se stejnou účinností (Hložánek *et al.* 1992).

2.6 Replikační cyklus RSV

Zjednodušené schéma replikačního cyklu v permisivních buňkách ukazuje obrázek 2.



Obrázek 2 | Replikační cyklus RSV. Převzato z Hughes 2004, upraveno.

2.6.1 Vstup do hostitelské buňky

Virové obalové glykoproteiny Env podskupin A–E a K jsou vysoce homologní, s výjimkou pěti hypervariabilních regionů v SU, *vr1*, *vr2*, *br1*, *br2* a *vr3*, z nichž zejména poslední tři zmíněné určují receptorovou, potažmo hostitelskou specifitu (Dorner *et al.* 1985; Bova *et al.* 1986; Bova *et al.* 1988; N. Cui *et al.* 2014). Env podskupiny J je vůči ostatním homologní pouze ze 40 % (Benson *et al.* 1998).

RSV podskupiny C využívá pro vstup do buňky receptor Tvc (tumor virus C) (Payne & Biggs 1970). Ten je v kuřecí populaci rozšířen ve dvou variantách kódovaných alelami *tv^s* (susceptibilní vůči podskupině C; dominantní) a *tv^r* (rezistentní; recesivní) (Motta *et al.* 1973). V roce 2005 byl receptor charakterizován, jedná se o 488 aminokyselin dlouhý protein homologní k savcím imunoglobulinům, kódovaný genem *BTN1A1* (butyrophilin, subfamily 1, member A1; Elleder *et al.* 2005; Burt *et al.* 2009). V savcích buňkách se podílí na regulaci sekrece kapének mléka (Ogg *et al.* 2004). Extracelulární část Tvc obsahuje dvě domény podobné imunoglobulinům, IgV a IgC. Pro interakci s EnvC jsou důležité dvě aromatické aminokyseliny v IgV, Trp-70 a Tyr-127; IgC zaručuje optimální vzdálenost vazebného místa od buněčné membrány (Munguia & Federspiel 2008). Sníženou citlivost vůči podskupině C mají křepelové, kteří sice mají Trp-70 a Tyr-127, ale předcházející aminokyselina je odlišná (Plachý *et al.* 2017). Sekvence kachního Tvc vykazuje podobné odlišnosti (GenID 101804743). Úplná rezistence je u kuřat navozená mutací zavádějící předčasný stop-kodón (Elleder *et al.* 2005).

Po interakci receptoru s Env dochází k receptorem zprostředkované endocytóze a virus je směrován do endozómů s kyselým pH, kde dochází k fúzi membrán a vstupu viru do cytoplazmy. Vstup RSV je zajímavý tím, že kombinuje pH nezávislé i pH závislé kroky. Virus v kyselém prostředí mimo hostitelskou buňku neztrácí svoji infektivitu, protože až po interakci Env s receptorem dochází k aktivaci (*priming*) Env, který se tím stává pH citlivým (Mothes *et al.* 2000). Buňky však mohou pomocí interferony stimulovaných transmembránových proteinů (IFITM) regulovat pH svých časných endozómů a zpožďovat tak časnou fázi infekce (Desai *et al.* 2017).

2.6.2 Reverzní transkripce a integrace

Poté, co virová kapsida opustí endozóm a vstoupí do cytoplazmy, probíhá reverzní transkripce gRNA pomocí reverzní transkriptázy, která je obsažena ve virionech (obr. 3). Už v tomto kroku je pro virus důležité, aby infikoval normálně se dělící buňku (Fritsch & Temin 1977), neboť pro

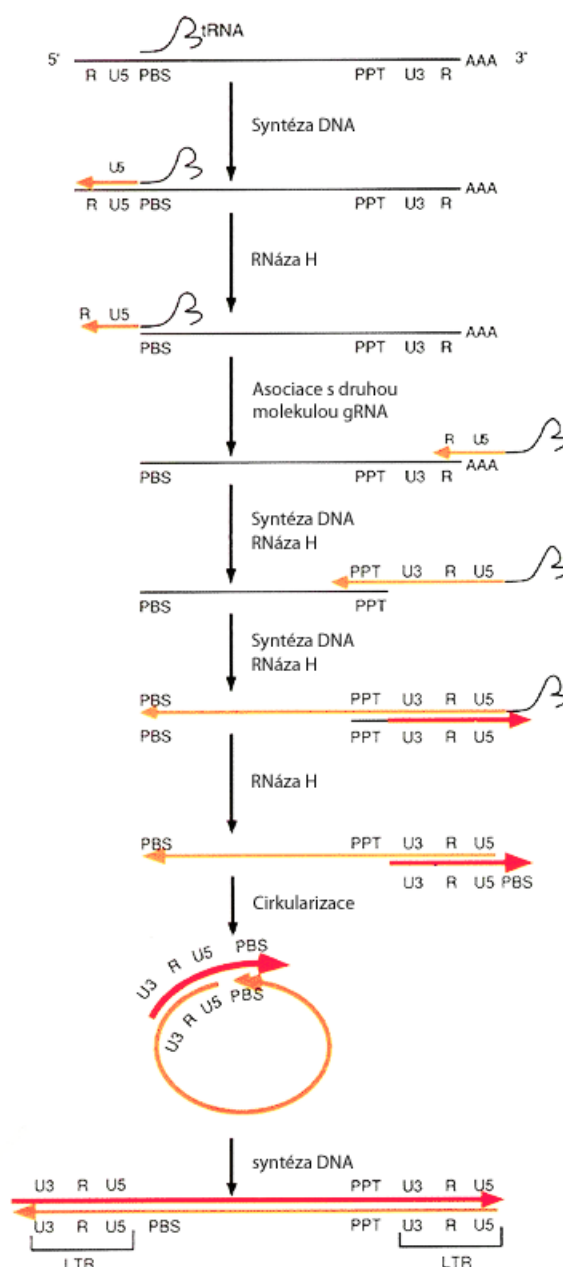
přepis gRNA do cDNA jsou nutné dNTP, které se v G₀ buňkách v dostatečné koncentraci nevyskytují.

Reverzní transkripce začíná z tRNA^{Trp} primeru, který se váže na vazebné místo pro primer (primer binding site, PBS) těsně za U5 oblastí (Sawyer *et al.* 1974). Reverzní transkriptáza (RT) pokračuje směrem k 5' čepičce a vznikající DNA-RNA komplex je rozpoznáván a štěpen RNázou H. Po naštěpení 5' R oblasti může DNA „přeskočit“ na 3' R oblast druhé molekuly gRNA a syntéza pokračuje. Jako primer pro druhé vlákno slouží polypurinový trakt, který odolává štěpení RNázou H. Takto vzniká provirová cDNA, která spolu s virovou integrázou a dalšími proteiny vstupuje ve formě preintegrčního komplexu do jádra, kde dochází k náhodné integraci.

2.6.3 Transkripce proviru

Integrovaný provirus je silně transkribovaný hostitelským aparátem (Gorman *et al.* 1982). Vše, co je pro jeho expresi nutné, se nachází v LTR oblastech, které jsou v proviru dvě, jedna na začátku, druhá na konci. Obě jsou shodné a jejich uspořádání je následkem reverzní transkripce. 5' konec LTR tvoří U3 oblast, která byla původně na 3' konci gRNA (Schwartz *et al.* 1977). Následuje repetitivní oblast společná pro 5' a 3' konec gRNA a U5 oblast, která pochází z 5' konce gRNA (Haseltine *et al.* 1977).

U3 obsahuje promotorové oblasti, CAT-box a TATA-box. Před nimi jsou tandemové repeti-



Obrázek 3 | Schéma reverzní transkripce. Ve virionech je kromě gRNA (černě) obsažena také tRNA, navázaná na vazebné místo pro primer (PBS). Z tohoto místa začíná reverzní transkripce a pokračuje k 5' konci. Virová RNáza H rozpoznává DNA-RNA komplex a průběžně degraduje RNA. Tak je umožněn „přeskok“ vznikající cDNA (oranžově) na komplementární R oblast na 3' konci a reverzní transkripce celé gRNA. Syntéza druhého vlákna cDNA (červeně) je zahájena na polypurinovém traktu (PPT), který je pro RNázu H obtížně štěpitelný. U3, U5, netranslatované oblasti na 3' resp. 5' konci gRNA; LTR, dlouhé koncové repetice. Převzato z Telesnitsky & Goff 1997, upraveno.

ce, které určují sílu exprese a nepřímo i patogenitu kmene (Hodgson *et al.* 1987). Na konci U3 začíná transkripce proviru, zároveň zde leží polyadenylační signál AAUAAA (Yamamoto *et al.* 1980). Polyadenylace je provedena ale až o několik nukleotidů později a tato oblast, dlouhá 20 nukleotidů, je tedy společná pro 5' a 3' konec. Nazývá se R a je nutná pro „přeskočení“ reverzní transkriptázy z 5' konce na 3' konec, aby došlo k přepsání celého genomu. Následuje U5, která vyplňuje prostor mezi R a PBS a je tedy přepsána do proviru dvakrát.

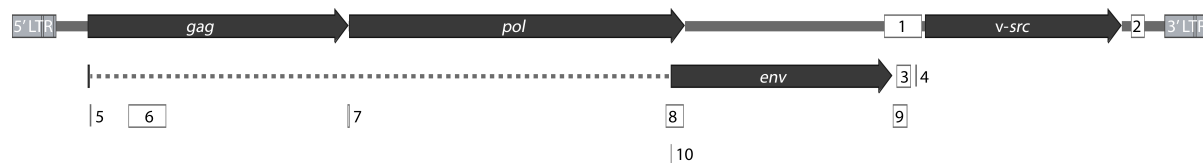
LTR oblasti mohou být zodpovědné za inzerční aktivaci buněčných protoonkogenů či vyřazení tumorsupresorů. Přestože RSV používá pro zahájení transkripce proviru 5' LTR a pro její terminaci 3' LTR, obě oblasti jsou shodné, a tak dokáže 5' LTR transkripci předchozího genu terminovat a 3' LTR zahajovat.

2.6.4 Regulace exprese virových proteinů

Eukaryotická mRNA je monocistronní, to znamená, že z každé mRNA je translatován pouze první gen. V případě RSV ale připadají na jeden promotor čtyři geny. RSV tento problém řeší alternativním sestřihem, z jednoho proviru vznikají tři různé populace mRNA, dvě sestřižené a jedna nesestřižená. Buněčná nesestřižená mRNA se obvykle nedostává do cytoplazmy, neboť pro její export z jádra je nutná vazba faktorů, které zodpovídají za její sestřih. Virus musí toto omezení překonat, a proto jeho genom obsahuje několik regulačních oblastí (obr. 4).

Na samotném začátku genu *gag* je sestřihové donorové místo, jehož sekvence není ničím neobvyklá. Následuje negativní regulátor sestřihu (NRS), který je umístěn v první polovině *gag*. Je dlouhý zhruba 230 nt a má dvě funkční domény: na purin bohatou oblast, o kterou kompetují SR proteiny s hnRNP H, a suboptimální sestřihový donor, který váže sestřihové faktory, ale neumožňuje samotný sestřih (McNally *et al.* 1991). Vazba hnRNP H vede k inhibici polyadenylace, naopak SR proteiny ji stimulují (Fogel *et al.* 2002; Wilusz & Beemon 2006; Maciolek & McNally 2007). Primární i sekundární struktura sestřihového donoru umožňují vazbu U1 a U11 sestřihových faktorů, které se každý účastní jiné sestřihové dráhy (McNally & McNally 1999; Cabello-Villegas *et al.* 2004). Jejich vazba potlačuje sestřih z funkčního sestřihového donoru a umožňuje export nesestřižené mRNA z jádra. Vzniká abnormálně velký sestřihový komplex obsahující zároveň U1, U2, U4, U5, U6, U11 a U12 (Gontarek *et al.* 1993).

Dále genom obsahuje dvě sestřihová akceptorová místa pro *env* a *v-src* mRNA, která spolu kompetují. Ani jedno z nich není optimální: *env* sestřihové místo obsahuje nekonsenzuální místo větvení a na puriny bohatý exonový sestřihový enhancer (ESE, exonic splicing element); *v-src*



Obrázek 4 | Regulační sekvence v genomu PR-RSV-C. Genom PR-RSV-C obsahuje několik oblastí, které regulují sestřih mRNA, její export a translaci. Černě jsou vyznačeny geny, šedivě dlouhé koncové repetice (LTR), bílými obdélníky následující regulační oblasti: **1**, oblast vlásenky okolo sestřihového akceptoru pro *v-src*; **2+3**, přímé repetice; **4**, sestřihový akceptor pro *v-src*; **5**, sestřihový donor; **6**, negativní regulátor sestřihu; **7**, sekvence zodpovědná za ribozomální posun čtecího rámce; **8**, exonový sestřihový enhancer; **9**, supresor sestřihu *v-src*; **10**, sestřihový akceptor pro *env*. Vytvořeno s využitím Schwartz *et al.* 1983; Katz & Skalka 1990; McNally *et al.* 1991; McNally & Beemon 1992.

sestřihové místo má zase nekonsenzuální polypyrimidinový trakt přerušovaný pěti puriny (Katz & Skalka 1990; McNally & Beemon 1992; Zhang & Stoltzfus 1995). Navíc je před *v-src* supresor sestřihu (SSS, *v-src* suppressor of splicing), který spolu se sestřihovým akceptorem vytváří sekundární strukturu a inhibuje sestřih. Sestřihový donor, NRS a akceptor pro *env* mají dohromady 28% účinnost sestřihu; účinnost kombinace sestřihového donoru, NRS, SSS a akceptoru pro *v-src* je také 28 % (McNally & Beemon 1992).

Pokud je optimalizováno místo větvení pro *env* mRNA, nevzniká dostatek nesestřižené mRNA. Revertanty mají mutace jak v místě větvení, tak v oblasti ESE (Katz & Skalka 1990). Pokud je upraven polypyrimidinový trakt před *v-src* sestřihovým akceptorem, ztrácí virus replikační schopnost, neboť nedochází k dostatečné syntéze Env (Zhang & Stoltzfus 1995). U replikačně kompetentních revertantů dochází k delecím a zkrácení polypyrimidinového traktu (Zhang *et al.* 1996).

Na začátku genu *env* je také několik skrytých (kryptických) sestřihových donorů. V přirozeném hostiteli jsou rozpoznány pouze s malou účinností, ale pokud se virus dostane do savčích buněk, může být RNA mezi těmito kryptickými místy a akceptorem pro *v-src* vystřižena (Berberich *et al.* 1990; Lounková *et al.* 2014). Vznikají tak populace aberantních jednou a dvakrát sestřižené mRNA.

Za normálních podmínek vzniká v buňkách kuřecí fibroblastové linie DF-1 infikovaných SR-RSV-D zhruba 62 % nesestřižené mRNA, 23 % tvoří mRNA pro *env* a 15 % pro *v-src* (Lounková *et al.* 2014). V kuřecích embryonálních fibroblastech (CEF) infikovaných PR-RSV-A vzniká zhruba 74–75 % nesestřižené mRNA, 13–16 % *env* mRNA a 9–13 % *v-src* mRNA (Berberich *et al.*

1990; Simpson & Stoltzfus 1994). Nejstabilnější je *env* mRNA s poločasem degradace 15 hodin, poločas degradace *v-src* mRNA je 10 hodin a nesestřižené mRNA 7 hodin (Stoltzfus *et al.* 1983).

Pro export nesestřižené mRNA z jádra je také nutná alespoň jedna z přímých repetice (direct repeats, DR) obklopujících z obou stran gen *v-src* (Ogert *et al.* 1996). Na ty se zřejmě váže některý z hostitelských faktorů, který zprostředkovává export. DR také stabilizují mRNA a prodlužují poločas degradace (Simpson *et al.* 1997) a zejména 3' DR jsou nutné pro skládání infekčních virionů (Simpson *et al.* 1998).

2.6.5 Gag – proteiny kapsidy

Gen *gag* kóduje kapsidový polyprotein a virovou aspartátovou proteázu (p15, PR), která při maturaci virionů odštěpuje sama sebe, dimerizuje a následně štěpí Gag na jednotlivé proteiny, p19 (matrixový protein, MA), p2a, p2b, p10, p27 (CA), p3, p12 (nukleokapsidový protein, NC) (Moelling *et al.* 1980). PR je zodpovědná za maturaci virionů těsně po vypuštění z buňky, což vede také ke změně morfologie – zatímco nematurované jsou typu A, maturované (infekční) jsou typu C. V RSV je PR kódovaná v *gag*, v savčích retrovirech je součástí *pol*, případně je její gen samostatně s vlastním čtecím rámcem. Důsledkem je, že viriony RSV obsahují mnohem více PR než viriony savčích retrovirů. Pokud by viriony neobsahovaly Gag, ale pouze Gag-Pol polyprotein, nemohla by být proteáza autokatalyticky vyštěpena a nedošlo by k maturaci virionů (Stewart & Vogt 1991; Craven *et al.* 1991).

MA pomocí kladně nabitých aminokyselin zprostředkovává kontakt s vnitřní stranou virového obalu. CA vytváří proteinovou kapsidu okolo nukleokapsidy, která je uprostřed virionu a je tvořena komplexem gRNA a NC.

2.6.6 Pol – enzymy časně fáze

Gen *pol* je exprimován rovněž z nesestřižené mRNA. Jeho čtecí rámec je oproti čtecímu rámcu *gag* posunut o -1 a těsně na něj navazuje. Aby bylo možné translatovat *pol*, musí dojít před stop-kodónem *gag* k ribozomálnímu posunu čtecího rámce (ribosomal frameshift) o jednu bázi zpět (obr. 5; Jacks & Varmus 1985). K tomu slouží sekvence AAAUUUA těsně před stop-kodónem *gag* a následující RNA vlásenka (Jacks *et al.* 1988). V přirozeném hostiteli vzniká z nesestřižené mRNA polyprotein Gag-Pol (Pr180) asi 20× méně než samotný Gag (Jacks & Varmus 1985). Tento mechanismus je mezi viry eukaryot běžný, využívají ho nejen retroviry a retrotranspozóny (Jacks *et al.* 1988; shrnuto v Atkins *et al.* 2016). Většina experimentů *in vitro* byla prováděna v lyzá-

tu králíciích retikulocytů a dá se předpokládat, že jde o velmi konzervovaný mechanismus nezávislý na druhu hostitele.

Polyprotein Pol je virovou proteázou štěpen na p68 (RT), p32 (integráza, IN) a p4 (Moelling *et al.* 1980; Alexander *et al.* 1987). Neštěpený Pol má sníženou aktivitu (Stewart *et al.* 1990). Jako aktivní enzym s aktivitou RT se vyskytuje heterodimer složený z podjednotek α a β , přičemž α podjednotkou je samotná RT a β podjednotku tvoří neštěpený polyprotein RT-IN. Vedle tohoto heterodimeru se ve virionu vyskytuje samotná IN. RT α , RT β a IN jsou zastoupeny zhruba ve stejném poměru.

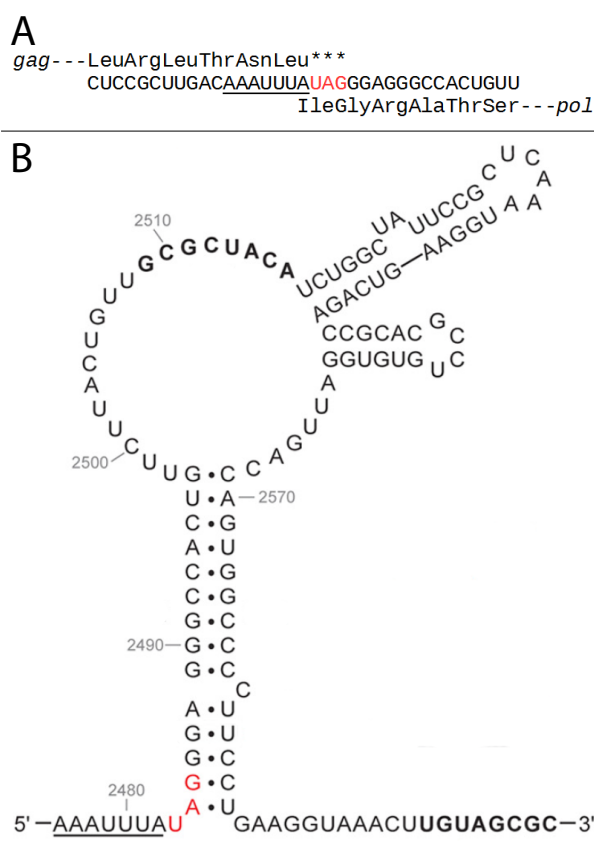
Protein p4 není nezbytný pro virovou replikaci, ale pravděpodobně působí jako inhibitor aktivity RT (Katz & Skalka 1988).

2.6.7 Env – obalový glykoprotein

Virový obalový glykoprotein Env je translatován ze sestřižené mRNA (Stoltzfus & Kuhner 1979). pre-mRNA obsahuje sestřižový donor a akceptor, mezi nimiž se nachází geny *gag* a *pol*, které jsou z *env* mRNA vystřiženy.

Iničiační kodón *env* se tak dostává do popředí a může být translatován hostitelskými ribozómy.

Prvních šest aminokyselin je stejných jako v sekvenci Gag (Ficht *et al.* 1984). Na začátku proteinového prekurzoru je signální sekvence, směřující translaci do endoplazmatického retikula, v něm vytváří Env homotrimery. Každá molekula Env je před vystavením na povrch buňky štěpena buněčnou proteázou furinem na dvě podjednotky, N-koncovou povrchovou a C-koncovou transmembránovou (TM), které zůstávají propojeny disulfidickou vazbou (Garten *et al.* 1994). SU podjednotky jsou zodpovědné za rozpoznání receptoru hostitelské buňky, TM podjednotky kotví SU k virovému obalu a zprostředkovávají fúzi virové a buněčné (endozomální) membrány.



Obrázek 5 | Oblast ribozomálního posunu čtecího rámce. Těsně před stop-kodónem genu *gag* (červeně) se vyskytuje „kluzká“ sekvence (podtrženo), na které se ribozóm zhruba v 5 % případů vrátí o jednu bázi zpět. K tomu je stimulován blízkou vlásenkou. **A** | Primární struktura mRNA doplněná o aminokyselinovou sekvenci vznikajících proteinů (podle Jacks *et al.* 1988). **B** | Sekundární struktura podporující posun čtecího rámce, tučně je vyznačena další oblast komplementarity (převzato z Nikolić *et al.* 2012, upraveno).

2.6.8 v-Src – nestrukturní onkoprotein

Výsledným produktem genu *v-src* je v-Src (pp60), fosfoprotein s kinázovou aktivitou, který je zodpovědný za rozvoj rakovinných procesů (Collett & Erikson 1978; Levinson *et al.* 1978). v-Src je také exprimován ze sestřižené mRNA. K sestřihu je využíván stejný donor jako u *env* mRNA, ale rozdílný akceptor. Navíc je v-Src kódován jiným čtecím rámcem než Env, takže neobsahuje leader sekvenci.

v-Src je homologem buněčného c-Src, což je protoonkogen, který reguluje buněčný růst (Parker *et al.* 1981). RSV získal *v-src* zřejmě po integraci před *c-src*, který byl následně sestřihován z virového sestřihového donoru a zabalen do kapsidy. Mutace v regulačních oblastech v-Src způsobují jeho konstitutivní aktivitu a schopnost transformovat infikované buňky (shrnutí v Martin 2001).

2.6.9 gRNA – virový genom

Nejdůležitější částí virionů je gRNA, jejímuž specifickému šíření virové proteiny pouze pomáhají. gRNA se musí dostat z jádra až pod buněčnou membránu, kde se viriony skládají. Musí být zabráněno interakci s ribozómy. Za transport gRNA je zodpovědný Gag. V oblasti NC obsahuje slabý jaderný lokalizační signál, díky kterému některé z molekul vstupují do jádra, kde vážou gRNA. Pro tuto vazbu je nezbytný enkapsidační signál ψ a alespoň jedna z DR (Sorge *et al.* 1983). Vznikají větší komplexy, jejichž jaderný lokalizační signál je skrytý, dochází k dimerizaci gRNA a jejímu přesunu k membráně. Tam se následně utváří kapsida.

2.6.10 Skládání virionů

Skládání virionů probíhá na cytoplazmatické membráně. Tam je transportován Gag díky signálu v MA (Verderame *et al.* 1996). Kladně nabitě aminokyseliny zajišťují vazbu s fosfatidylinositol-(4,5)-bisfosfátem, který se nachází právě na cytoplazmatické membráně. Dochází k postupnému skládání Gag pomocí interakcí v CA, membrána kolem vznikající kapsidy se zakřivuje a viriony jsou odškrbeny z buňky. Posléze dochází k jejich maturaci pomocí virové proteázy.

2.7 Defekty replikace v cizodruhovém hostiteli

Analýza defektů na molekulární úrovni byla zatím provedena pouze na nepermisivních savcích buňkách. Savčí buňky kódují řadu restrikčních faktorů, kterými se účinně brání proti virovým infekcím (shrnutí v Zheng *et al.* 2012). Jsou evolučně vzdáleni ptákům a jednoduché ptačí retroviry nejsou připravené na souboj s jinak a lépe vybaveným hostitelem. Expresce restrikčních

faktorů je většinou indukovaná interferony, což dává viru při prvotní infekci malý náskok. Kachny a kuřata také kódují interferony (Schultz & Chisari 1999). Rozšířeným antivirovým faktorem jsou cytidin deaminázy, které zejména u savců brání šíření viru zaváděním mutací do jeho cDNA během reverzní transkripce. Ptáci ještě takto specializované enzymy nemají, kódují pouze AID a APOBEC1. AID působí v jádře a při jejím nadexprimování dokáže působit proti cccDNA viru kachní hepatitidy B (Chowdhury *et al.* 2013).

Jako restriční faktory mohou také působit endogenní retrovirové sekvence. Pokud je exprimován Env, dochází k blokování vazebných míst na receptoru, které rozpoznávají retroviry stejné podskupiny (Robinson *et al.* 1981).

Savčí buňky nemají receptory pro RSV. Proto je pro vyvolání nádorového bujení *in vivo* nutné do živého organismu transplantovat virus produkující buňky, kdy zřejmě dochází k cell-to-cell kontaktu infikovaných a neinfikovaných buněk a virus se může šířit i přes absenci receptoru. Integrace proviru do savčího genomu byla pozorována pouze v laboratorních podmínkách (Svoboda 1960). Tak byly získány krysí linie XC a křeččí linie H-20, které obsahují RSV proviry, ale neprodukují infekční virus. Pro transformaci křeččích embryonálních fibroblastů *in vitro* stačilo kulturu infikovat bezbuněčným filtrátem, čímž vznikla linie RSCh (Hložánek *et al.* 1966). Všechny zmíněné linie slouží jako model pro studium buněčné nepermissivity v naší laboratoři (Lounková *et al.* 2014).

Savčím buňkám chybí faktory nutné pro produkci virového potomstva. Dají se doplnit pomocí fúzí s kuřecími buňkami (Svoboda *et al.* 1967, citováno podle Svoboda & Dourmashkin 1969). Nejvíce je blokována produkce Env, za což mohou pozměněné sestřihové poměry. Je produkováno relativně méně nesestřižené mRNA, *env* není produkován téměř vůbec (Berberich *et al.* 1990; Lounková *et al.* 2014). Pro sestřih jsou využita i kryptická sestřihová místa a vznikají tak nové populace mRNA (Broome & Gilbert 1985). Také export nesestřižené mRNA z jádra je snížený.

Zároveň jsou v savčích buňkách alfaretrovirové promotory methylovány, což snižuje transkripci proviru (Searle *et al.* 1984).

Experimenty zkoumající molekulární podstatu semipermissivity kachen zatím nebyly provedeny.

3. Cíle práce

Kachní buňky jsou semipermissivní vůči RSV podskupiny C. Virus dokáže buňky infikovat, produkce virového potomstva je ale velmi slabá. Tato diplomová práce si klade následující cíle:

1. Odhalit, v kterém kroku je replikační cyklus RSV v kachních buňkách blokován.
2. Zjistit, zda tento blok má dominantní účinek – zda jej způsobuje restriční faktor, který kachny používají v antivirové obraně, nebo jestli se virus v kachních buňkách replikuje špatně kvůli absenci některého z hostitelských faktorů (recesivní účinek).
3. Lokalizovat oblast genomu daPR-RSV-C, virového kmenu adaptovaného na replikaci v kachních buňkách, která je zodpovědná za zmírnění replikačních defektů.

Pro splnění těchto cílů byly provedeny *in vitro* experimenty s kachními a kuřecími buněčnými kulturami. Ty byly paralelně infikovány viry odvozenými z RSV, které mají onkoprotein v-Src nahrazený zeleným fluorescenčním proteinem. Pro detekci a kvantifikaci infikovaných buněk bylo využito fluorescenčních technik – mikroskopie a průtokové cytometrie. Pro základní charakterizaci faktoru zodpovědného za defekt byly provedeny buněčné fúze.

4. Materiály a metody

4.1 Materiály

4.1.1 Bakteriální kmeny a jejich kultivace

Pro klonování byly použity kompetentní buňky *Escherichia coli* XL-Blue, skladované při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Byly kultivovány v tekutém, či na pevném médiu. Tekutým médiem bylo LB (Příprava tkáňových médií a roztoků při ÚMG), buňky byly třepány v bakteriálních zkumavkách při 250 ot.min^{-1} a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Pevným médiem byl LB agar s ampicilinem ($100\text{ }\mu\text{g/ml}$) na bakteriálních plastových plotnách (Příprava tkáňových médií a roztoků při ÚMG), na nich byly buňky kultivovány při $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, či při pokojové teplotě, podle požadované rychlosti zdvojení. Narostlé plotny byly skladovány při $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.1.2 Buněčné kultury a jejich kultivace a uchování

K experimentům byly použity kuřecí a kachní buněčné kultury: kuřecí fibroblastová linie prostá endogenních alfaretrovirových provirů (DF-1; Himly *et al.* 1998), kuřecí linie bez Tvc receptoru (DF-1/ Δ Tvc, klon B 11-1-4; připravená v naší laboratoři Annou Lounkovou a Dr. Josefem Gerykem, obsahuje předčasný stop-kodón v *tv* způsobený delecí zavedenou pomocí CRISPR/Cas9 systému); kachní sekundární embryonální fibroblasty (DEF; připravené Dr. Josefem Gerykem z 12denních embryí kachen plemene Khaki Campbell chovaného ve zvěřinci ÚMG), kachní immortalizovaná linie K 7-7.

K 7-7 připravil Dr. Josef Geryk transfekcí DEF plazmidem pRNS-1, obsahujícím genom viru SV40 s delecí v Ori a G418 rezistencí pod RSV promotorem (Litzkas *et al.* 1984). Transfekované buňky byly selektovány pomocí G418 a 2× klonovány, s cílem získat fibroblastický fenotyp udržující kontaktní inhibici. Výsledná linie byla 100× pasážována a následně zamražena.

Buňky byly kultivovány v médiu NP DF-1 s přidavkem 100 U/ml penicilinu a $100\text{ }\mu\text{g/ml}$ streptomycinu ($1\times$ antibiotic-antimycotic solution, Sigma) v termostatu při teplotě $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ a 3,5% koncentraci CO_2 . Pasážovány byly každé 3–4 dny.

Buňky byly skladovány při teplotě $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ v zamrazovacím médiu.

4.1.3 Viry a vektory

Jako referenční byl použit Pražský kmen viru Rousova sarkomu podskupiny C (PR-RSV-C, izolát B2) poskytnutý prof. Janem Svobodou. Pro experimenty byl použit RCAS systém. Jedná se o cirkulární plazmid nesoucí provirus RCAS a zároveň oblasti nutné pro replikaci plazmidu v bakteriálních buňkách (obr. 6). Pro selekci prokaryotických buněk nese ampicilinovou rezistenci. Po transfekci eukaryotických buněk jsou z proviru transkribovány virové RNA a buňky produkují replikačně kompetentní virus.

V experimentech byly použity viry vycházející z konstruktu RCASBP-A-GFP, poskytnutého naší laboratoří Markem Federspielem. Provirus je odvozený z SR-RSV-A, reverzní transkriptáza pochází z BH-RSV (BP = Bryan polymerase), což umožňuje dosahovat vysokých titrů produkovaného viru. *v-src* je nahrazen *egfp*, který kóduje zelený fluorescenční protein (GFP) (Federspiel & Hughes 1997). Od RCASBP-A-GFP je odvozený RCASBP-C-GFP, který byl rovněž poskytnut Markem Federspielem a kóduje Env složený z SU podjednotky podskupiny C a TM podjednotky podskupiny A.

Z plazmidu RCASBP-C-GFP byl Danou Kučerovou vytvořen plazmid RCASBP- Δ env-GFP, který obsahuje několik předčasných stop-kodónů za XhoI restrikčním místem na začátku *env*. Ten Dr. Josef Geryk transfekoval spolu s plazmidem kódujícím povrchový glykoprotein viru vezikulární stomatitidy (VSV-G) do DF-1 a vytvořil pseudotypovaný virus RCASBP- Δ env-GFP(VSV-G).

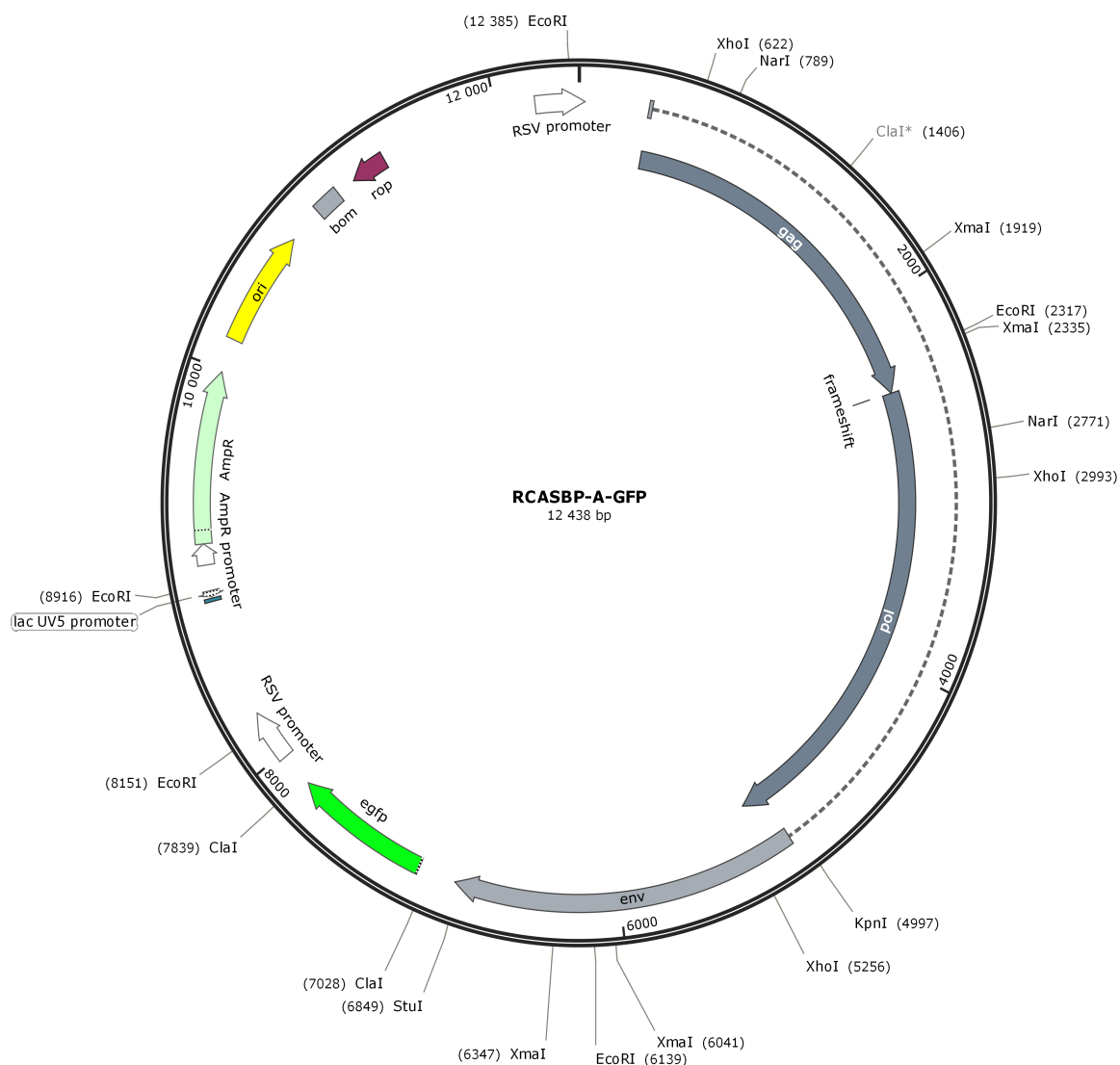
RCASBP-EnvC-GFP připravila z plazmidu RCASBP-A-GFP Anna Lounková náhradou celého *env* mezi restrikčními místy KpnI a StuI za *env* podskupiny C. Také připravila replikačně kompetentní pseudotypovaný virus RCASBP-EnvC-GFP(VSV-G), který na svém povrchu kombinuje EnvC a VSV-G.

Genomy zmíněných virů jsou spolu s nově vytvořenými schématicky zobrazeny v kapitole Výsledky na str. 59. Pokud v textu není uvedeno jinak, zkratkou RCASBP jsou míněny viry, nikoliv plazmidy.

Plazmidy pAG3 (LTR- ψ -egfp-LTR; Šenigl *et al.* 2012) a pcGagPol (Plachý *et al.* 2010) poskytl Filip Šenigl.

Pro klonování PCR produktů bylo využito pGEM[®]-T Easy vektorového systému (Promega).

Plazmidy byly uchovávány při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, viry v alikvótech při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.



Obrázek 6 | Schéma plazmidu RCASBP-A-GFP. Vyznačena jsou místa rozpoznávaná restrikcčními endonukleázami využitými při molekulárním klonování. Podle Hughes 2004.

4.1.4 Primery

V celé práci využívám primery svých kolegů uvedené v tabulce 4. Primery M13 umožňují sekvenování inzertu v pGEM®-T Easy vektoru a byly přidány do vzorků přímo firmou SEQme.

Tabulka 4 | Použité primery s uvedením sekvence, teploty nasedání (t_A) a osoby, která je poskytla.

navrhnul(a)	označení	sekvence	t _A
Anna Lounková	RSV_fw	CTTAGGAGGGCAGAAGCTGA	61 °C
	RSV_fw2	CCGAGAACTCAGAGGGTCGT	61 °C
	RSV_unspl1_rv	GTTTACACGCGGACGAAAT	61 °C
	RSV_spl_envC_rv	GTTGGCCCATGTAATCCAAA	61 °C
	RSV_spl_src_rv	GAGGCCACCAGCAGAGTC	61 °C
	PR-RSV_EndPol_fw	TTTGGGTACCCTCTCGAAAAGT	65 °C
	EnvEndStul_rv	ACAGGCCTTTTGCATCTTCCTGTATTTCAGTA	65 °C
	RAV-0_p27_fw	CAGGCCGCATTATTAAGACC	59 °C
	RAV-0_p27_rv	TGGCTGTGACTTCTGCCTAA	59 °C
	EnvE_fw	GGCTTCGCCCCACACTCCAA	59 °C
	EnvE_rv	GCACATCTCCACAGGTGTAAAT	59 °C
	chEnv_qPCR_fw	GAAACTACCTTGTGTGCTGTCG	59 °C
	chEnv_qPCR_rv	CGGATGTTGTGGAAAAACGA	59 °C
	chEnv233_fw	ACGGATTCTGCCTCTCTACACA	59 °C
	chEnv1046_rv	TTCCTTGCCATGCGCGATCCC	59 °C
Martina Benešová	GFP_start_fw	CCATGGTGAGCAAGGGC	61 °C
	GFP_seq_rv	CTGAACCTGTGGCCGTTTAC	61 °C
David Příkryl	chGAPDH1	AACTTTGGCATTGTGGAGGG	61 °C
	chGAPDH2	ATCCACCGTCTTCTGTGTGG	61 °C
Dr. Volodymyr Stepanets	tvc_dBL1	GATGGTCTTTGGCTGCCACCTCC	61 °C
	tvc_dBR2	CGCACCTCCATGTCCTGCAC	61 °C
SEQme	M13F	TGTA AACGACGGCCAGT	–
	M13R	CAGGAAACAGCTATGACC	–

4.1.5 Roztoky používané při práci s buněčnými kulturami

Složení nejčastěji používaných roztoků je uvedeno v tabulce 5.

Tabulka 5: Média a další roztoky používané při práci s buněčnými kulturami.

TK H ₂ O	autoklávovaná ddH ₂ O (Přípravna tkáňových médií a roztoků při ÚMG)
NP	DMEM:F-12 2× (Life Technologies) + 0,123 % (w/v) NaHCO ₃ + TK H ₂ O
NP DF-1	NP + 5 % (v/v) telecí sérum (Gibco) + 1 % (v/v) kuřecí sérum + 1–5 % (v/v) fetální telecí sérum (fetal calf serum, FCS) + 10 % (v/v) tryptózo-fosfátový bujón (2,95%; Life Technologies)
zamrazovací médium	NP DF-1 + 10 % (v/v) FCS + 10 % (v/v) DMSO
trypsin + EDTA	0,125% (w/v) trypsin + 0,01% (w/v) EDTA v PBS (vše Přípravna tkáňových médií a roztoků při ÚMG)

4.2 Metody

4.2.1 Zásady práce s buněčnými kulturami

Veškerá manipulace s buněčnými kulturami probíhala v prostorách k tomu určených s úrovní zabezpečení BSL-1. Buňky byly kultivovány na sterilním plastu výrobců VWR a TPP, veškerý kontakt byl prováděn sterilními nástroji ve sterilním laminárním boxu. Kontaminovaný materiál byl dezinfikován 10% roztokem chlornanu sodného (Penta), plast byl navíc autoklávován. Laminární box byl před prací i po ní sterilizován UV-C zářením.

Zásobní kultury byly kultivovány standardně v 75 mm² kultivačních lahvích s 20–25 ml média, případně na P100 miskách s 12–15 ml média. Pokud není uvedeno jinak, byly v experimentech použity následující objemy média: na P60 misku bylo aplikováno 5 ml média, na každou jamku 6jamkové desky 2 ml, na 12jamkovou 1 ml, na 24jamkovou 500 µl, na 96jamkovou 200 µl média.

4.2.2 Pasážování buněk

Buněčné kultury byly zbaveny zbytků sérového média oplachem PBS (Příprava tkáňových médií a roztoků při ÚMG), následně byl přidán roztok trypsin + EDTA v množství, které pokrylo celé dno kultivačního plastu. Ihned byla většina roztoku odsáta tak, aby bylo množství roztoku minimalizováno, ale zároveň nehrozilo riziko oschnutí buněk. Buňky byly s roztokem inkubovány 6–8 minut při 37 °C, následně bylo vizuálně zkontrolováno působení roztoku a zastaveno přidáním média NP DF-1 zahřátého na 37 °C. V tomto médiu byly buňky uvedeny do suspenze, jejíž nadbytečná část byla odstraněna. Poté bylo doplněno médium NP DF-1 do objemů běžných pro daný typ kultivačního plastu.

4.2.3 Vysévání buněk

Buněčná suspenze byla po pasáži přenesena do 50ml zkumavky. Pomocí Bürkerovy počítací komůrky bylo zjištěno množství buněk a definovaný počet byl vyset na kultivační plast. Pokud není uvedeno jinak, bylo na 6jamkovou desku nasazeno 200 tisíc buněk, na 12jamkovou 100 tisíc, na 24jamkovou 50 tisíc a na 96jamkovou 10 tisíc buněk.

Buňky obvykle přisedly 4–5 hodin po vysetí.

4.2.4 Skladování buněk

Buněčná suspenze po pasáži byla přenesena do 15ml zkumavky a centrifugována 10 minut při $300\times g$. Po odsátí supernatantu byly buněčný pelet resuspendován v zamrazovacím médiu, buňky byly ihned přeneseny do zamrazovacích zkumavek (Nunc) a v zamrazovacích krabičkách (Nalgene) s izopropanolem mraženy rychlostí $1\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ v -80°C mrazícím boxu. Po 24 hodinách byly zkumavky přeneseny do skladovacích krabiček a skladovány při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.2.5 PERT

2 dny po infekci bylo odebráno médium ze vzorků a zbaveno fragmentů buněk centrifugací 20 minut při $13\,000\times g$ a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Následně bylo 200 μl skladováno při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

PERT (Product-enhanced reverse transcriptase) esej v naší laboratoři rutinně zajišťuje David Příkrýl podle dříve publikovaného protokolu (Fábryová *et al.* 2015).

V každém měření byly přítomny negativní kontroly pro každý buněčný typ a pozitivní kontrola infikovaná známým titrem viru. Relativní aktivity reverzní transkriptázy v každém vzorku (sam) vůči pozitivní kontrole (pos) byly vypočteny z poskytnutých hodnot Cq podle vzorce $2^{(Cq_{\text{pos}} - Cq_{\text{sam}})}$ v tabulkovém procesoru Microsoft Excel.

4.2.6 PCR s OneTaq polymerázou

Pro kvalitativní detekce konkrétních úseků v DNA byla použita PCR s OneTaq polymerázou obsaženou v OneTaq® 2 \times Master Mix (NEB). Do 25 μl reakce byly přidány specifické primery o konečné 400 nM koncentraci, templát a TK H₂O.

Podmínky reakce byly následující: 4 min při $95\text{ }^{\circ}\text{C}$; 35 cyklů sestávajících z 20 s při $95\text{ }^{\circ}\text{C}$, 30 s při t_A uvedené v tabulce 4 a 1 min/kb produktu při $68\text{ }^{\circ}\text{C}$; a závěrečná elongace 5 min při $68\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.2.7 PCR detekce endogenních retrovirových sekvencí

Endogenní alfaretrovirové sekvence byly detekovány z 20 ng cDNA pomocí PCR s OneTaq polymerázou a primery do konzervovaných oblastí *gag* (p27_fw + p27_rv) a *env* (chEnv233_fw + chEnv1046_rv; EnvE_fw + EnvE_rv; qPCR_Env_fw + qPCR_Env_rv).

4.2.8 PCR s Phusion polymerázou

Pro účely molekulárního klonování byla použita Phusion Hot Start II DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific). V 50 μl reakci byl 5 \times Phusion HF pufr, 200 mM každý z dNTP, 500 mM specifické primery, 1 U polymerázy, templát a TK H₂O.

Reakce probíhala za těchto podmínek: 30 s při 98 °C; 35 cyklů sestávajících z 15 s při 98 °C, 30 s při t_A uvedené v tabulce 4 a 30 s/kb produktu při 72 °C; a závěrečná elongace 7 min při 72 °C.

4.2.9 Agarózová elektroforéza a izolace fragmentů DNA z gelu

Pro rozdělení fragmentů DNA v elektrickém poli byl připraven 2% gel agarózy (Bioline) v TAE pufru (40 mM Tris (Sigma), 10 mM EDTA pH 8,0 (Serva), 0,112% kyselina octová (v/v; Penta)), voda s ethidium bromidem (0,5 µg/ml). Vzorky byly smíchány s nanášecím pufrem, nanесeny do připravených jamek v gelu a rozděleny působením elektrického pole 5 V.cm⁻¹ po dobu 40 minut.

DNA fragmenty byly vizualizovány pomocí UV záření a oblasti zájmu byly z gelu vyřezány a přeneseny do mikrozkuavek. Následně byla DNA extrahována pomocí QIAEX[®] II Gel Extraction Kit (Qiagen).

4.2.10 Měření koncentrace nukleových kyselin

Pro měření koncentrace nukleových kyselin byl použit spektrofotometr NanoDrop ND-1000. Koncentrace byla stanovena pomocí obslužného počítačového programu z hodnoty absorbance při 260 nm; čistota vzorků byla kontrolována pomocí poměrů absorbancí při vlnových délkách 260/230 a 260/280 nm.

4.2.11 Sekvenování

Přečištěné PCR produkty byly podle instrukcí dodavatele (SEQme) doplněny specifickými primery a předány k provedení Sangerova sekvenování. Získané sekvence byly kontrolovány v programu Chromas Lite a následně zpracovány v programech Vector NTI 7, SnapGene či pomocí cloudové aplikace Benchling. Z jedné sekvenační reakce bylo dobře čitelných zhruba 1000 bází.

4.2.12 Molekulární klonování do pGEM

Úseky daPR-RSV-C ohraničené primery RSV_fw + RSV_spl_envC_rv (daGag) a PR-RSV_End-Pol_fw + EnvEndStuI_rv (daEnv) byly amplifikovány pomocí PCR s Phusion polymerázou a přečištěny. 3' konce byly doplněny o adenin pomocí Taq polymerázy (Biotherm) v prostředí s 0,4 mM dATP, 30 minut při 72 °C.

Tyto inzerty byly následně v poměru 3 : 1 ligovány do vektoru pomocí pGEM[®]-T Easy vector systému (Promega), 2 hodiny při pokojové teplotě. Poté byly vzniklým plazmidem transformovány bakterie XL-BLUE a vysety na agarové plotny P100 doplněné o ampicilin, 4 µl 1M IPTG a 1 mg X-Gal. Po noční kultivaci při 37 °C byly vybrané bílé kolonie přeneseny do zkumavek

s LB a ampicilinem a třepány přes noc při 37 °C. Následně byly plazmidy izolovány na kolonách pomocí MINIPrep systému (Qiagen).

pGEM-daGag byl sekvenován pomocí primerů M13F, M13R, RAV-0_p27_fw a RAV-0_p27_rv.

pGEM-daEnv byl sekvenován pomocí primerů PR-RSV_EndPol_fw a EnvEndStuI_rv.

Pro přípravu pGEM-daEnv(C) byl štěpen 1 µg plazmidů pGEM-PRRSV-1B (poskytnutý Annou Lounkovou, obsahuje EnvC) a RCASBP-daEnv-GFP pomocí 20 U XhoI a 10 U XmaI v CutSmart® pufru 2 h při 37 °C (vše NEB). Přechištěný fragment daEnv z RCASBP byl smíchán s vektorem pGEM v poměru 3 : 1 a ligován pomocí T4 DNA ligázy (NEB) (2 h, RT). Následně jím byly transformovány XL-BLUE.

pGEM-daEnv(C) byl sekvenován pomocí primerů M13F a M13R.

4.2.13 Transformace bakterií

50–200 ng plazmidu bylo půl hodiny na ledu inkubováno s kompetentními bakteriemi XL-BLUE. Následně byly buňky transformovány pomocí 90s teplotního šoku při 42 °C.

4.2.14 Molekulární klonování do RCAS

1 µg každého z plazmidů byl štěpen pomocí restričních endonukleáz a vzniklé fragmenty byly přechištěny v agarózovém gelu.

Pro přípravu RCASBP-daEnv-GFP byly kombinovány produkty vzniklé po štěpení plazmidů pGEM-daEnv a RCASBP-C-GFP pomocí 20 U KpnI HF a 10 U StuI, pro přípravu RCASBP-daEnv(C)-GFP byly kombinovány produkty vzniklé po štěpení plazmidů pGEM-daEnv(C) a RCASBP-C-GFP rovněž pomocí 20 U KpnI HF a 10 U StuI. Pro přípravu RCASBP-daGag-EnvC-GFP byly kombinovány produkty vzniklé po štěpení plazmidů pGEM-daGag a RCASBP-EnvC-GFP pomocí 5 U NarI. Všechna štěpení probíhala v CutSmart® pufru přes noc při 37 °C (vše NEB).

Inzerty vyštěpené z pGEM byl míchány s vektory RCASBP v poměru 3 : 1 a ligovány pomocí T4 DNA ligázy (NEB) (2 h, RT). Vzniklé plazmidy byly transformovány do XL-BLUE, selektovány na miskách s ampicilinem, klonovány a izolovány pomocí MINIPrep systému.

Úspěšnost klonování byla ověřena restričním štěpením 0,5 µg plazmidů a vizualizací fragmentů pomocí agarózové elektroforézy. RCASBP-daEnv-GFP byl štěpen pomocí 10 U KpnI HF a 10 U BstBI, RCASBP-daEnv(C) pomocí 5 U BglII, RCASBP-daGag-EnvC-GFP pomocí 2,5 U MscI. Všechna štěpení probíhala v CutSmart® pufru 1 h při 37 °C (vše NEB).

Vybrané plazmidy byly sekvenovány, RCASBP-daEnv-GFP pomocí primerů PR-RSV_EndPol_fw, RSV_spl_envC_rv, chEnv_qPCR_fw, chEnv_qPCR_rv, EnvEndStuI_rv a RSV_spl_src_rv.

4.2.15 Transfekce buněk

Den před transfekcí bylo na P60 misku vyseto 900 tisíc buněk pro dosažení zhruba 75% konfluence. Transfekce byla provedena s využitím Lipofectamine™ 3000 (Invitrogen) podle přiloženého protokolu, bylo transfekováno 5 µg DNA.

Následně byly buňky kultivovány za standardních podmínek. Den po transfekci bylo vyměněno médium.

4.2.16 Infekce buněk

Před infekcí byl na kultivační plast nasazen definovaný počet buněk. 4–6 hodin po vysetí a po vizuální kontrole, že buňky přisedly, bylo odsáto médium a infikováno virem naředěným v médiu NP DF-1 tak, aby objem přidávaný na buňky činil 10 % objemu média standardně přidávaného na kultivační plast. Po 30 minutách inkubace v termostatu bylo médium doplněno do standardního objemu. Druhý den bylo médium vyměněno.

Pro kvantifikaci viru v médiu bylo na jamku 24jamkové destičky přidáváno celých 500 µl testovaného média odebraného z infikovaných a cytometricky charakterizovaných buněk. Následující den bylo médium vyměněno a dva dny po infekci byl cytometricky detekován podíl GFP-pozitivních buněk. Ten byl normalizován na promořenost kultury, ze které bylo testované médium odebráno.

V případě kvantifikace v médiu z fúzovaných buněk nebyla nutná normalizace na promořenost kultury, neboť byly v rámci experimentu vysévány již infikované buňky.

4.2.17 Izolace RNA a příprava cDNA

Celková RNA byla izolována pomocí RNeasy® RT s 4-bromanisolem (obojí Molecular Research Center, Inc.) podle přiloženého protokolu a následně skladována při –80 °C. Vzorky RNA byly přepsány do cDNA pomocí rekombinantní reverzní transkriptázy Moloneyho viru myší leukémie ProtoScript® II (NEB) s využitím náhodných hexanukleotidů (Promega). V 50µl reakci byl dodávaný reakční pufr, 10 mM DTT, 0,25 mM každý z dNTP, 1 µg náhodných primerů, 100 U reverzní transkriptázy a 1 µg RNA.

Podmínky reakce: 10 min při 25 °C, 50 min při 42 °C a 20 min při 65 °C.

4.2.18 Kvantitativní PCR (qPCR) a analýza výsledků

Pro 20 µl qPCR reakci byl použit 1 µl (20 ng) cDNA a Mesa green qPCR MasterMix Plus for SYBR assay kit (Eurogentec) v CFX96 systému (Bio-Rad). Virové transkripty byly detekovány pomocí specifických primerů (každý o konečné 400nM koncentraci), RSV_fw2 a RSV_unspl1_rv pro detekci virové nesestřížené mRNA, RSV_fw2 a RSV_spl_envC_rv pro *env* mRNA, RSV_fw2 a RSV_spl_src_rv pro *v-src* mRNA, GFP_start_fw a GFP_seq_rv pro celkovou RNA viru RCA-SBP-C-GFP. Pro ověření kvality vzorků bylo změřeno množství transkriptů genů *GAPDH* pomocí primerů chGAPDH1 a chGAPDH2.

Podmínky reakce pro nesestříženou virovou RNA, *v-src* mRNA, celkovou virovou RNA a *GAPDH* byly následující: 5 min při 95 °C; 40 cyklů sestávajících z 15 s při 95 °C, 20 s při 61 °C, 20 s při 72 °C a fluorescenční detekce množství amplifikované DNA; a závěrečná elongace 10 min při 72 °C.

Pro *env* mRNA byly podmínky reakce: 5 min při 95 °C; 40 cyklů sestávajících z 15 s při 95 °C, 20 s při 61 °C, 35 s při 72 °C a fluorescenční detekce množství amplifikované DNA; a závěrečná elongace 10 min při 72 °C.

Výsledkem qPCR byly hodnoty *C_q* vyjadřující cyklus, při kterém množství fluorescenčně detekované DNA v dané reakci překročilo prahovou hodnotu. Jednotlivé vzorky byly v triplicátech, z nichž byla získána průměrná hodnota *C_q* daného vzorku. Případné odlehlé hodnoty *C_q* nebyly do analýzy zahrnuty.

Pro každou sadu primerů byla spočtena účinnost (*E*) reakce z kalibrační křivky, pro jejíž konstrukci byly použity hodnoty *C_q* jednoho z pozitivních vzorků, který byl ředěný 10⁰–10⁴. Relativní množství virových transkriptů (*Q_R*) bylo stanoveno v tabulkovém procesoru Microsoft Excel s využitím vztahu:

$$Q_R = \frac{1 + E_{\text{ref}}^{C_{q_{\text{ref}}}}}{1 + E_{\text{tar}}^{C_{q_{\text{tar}}}}},$$

kde ref je referenční transkript a tar je cílový transkript.

4.2.19 Izolace chromozomální DNA

Genomová DNA byla izolována fenol-chloroformovou metodou.

Konfluentně narostlé buňky byly opláchnuty PBS (Přípravna tkáňových médií a roztoků při ÚMG) a převedeny do suspenze pomocí roztoku trypsin + EDTA. Tato suspenze byla centrifugována 10 minut při 300× *g*. Buněčný pelet byl resuspendován v 800 µl lyzačního pufru (0,25 M

EDTA, pH 8,0; 1% SDS), následně byla přidána proteináza K na výslednou koncentraci 1 mg/ml. Buňky byly lyzovány přes noc při 50 °C za pomalého převrácení zkumavek. Poté bylo přidáno 250 µg RNázy a inkubováno další hodinu při 50 °C a pomalém převrácení zkumavek. Po skončení inkubace bylo přidáno 800 µl směsi fenol-chloroform (1 : 1, pH 7,9), vzorky byly jemně protřepány a následně centrifugovány 5 minut při 24 000× g a pokojové teplotě. Horní fáze byla převedena do čisté mikrozkušavky. Tento krok byl proveden 1–2× se směsí fenol-chloroform a jednou se samotným chloroformem. Následně byl přidán 1 objem vychlazeného 96% ethanolu a po jemném protřepání byl centrifugací 3 minuty při 24 000× g a pokojové teplotě oddělen pelet vysrážené DNA. Tento pelet byl opláchnut 1 ml 80% ethanolu, osušen na suchém bloku při 37 °C a rozpuštěn přes noc při 37 °C ve vodném roztoku TE (10 mM Tris-HCl, pH 7,6; 0,1 mM EDTA). Takto vyizolovaná gDNA byla uchována při 4 °C.

4.2.20 Příprava buněčných lyzátů pro PCR

Konfluentně narostlé buňky byly opláchnuty PBS (Přípravna tkáňových médií a roztoků při ÚMG) a resuspendovány v lyzačním pufru pro qPCR (10 mM Tris-HCl, pH 8,0; 1 mM EDTA; 0,2 mM CaCl₂; 0,001% Triton X-100; 0,001% SDS; 1 mg/ml proteinázy K). Takto připravené lyzáty byly přeneseny do mikrozkušavek a inkubovány 1 hodinu při 58 °C a 10 minut 95 °C a následně skladovány při –20 °C.

4.2.21 Fluorescenční mikroskopie

Infikované buňky byly pozorovány inverzním mikroskopem Olympus IX51 s fluorescenčním světelným zdrojem U-LH100HG v modrém excitačním spektru s filtrem propouštějícím zelené světlo.

4.2.22 Průtoková cytometrie a analýza výsledků, přepočet na množství viru

Semikonfluentně narostlé buňky byly pasážovány, následně bylo po 200 µl suspenze přeneseno na 96jamkovou destičku s U-profilem dna. Destička byla centrifugována 5 minut při 320× g, supernatant dekantován a buňky resuspendovány v PBS s Hoechst 33258.

Měření probíhalo na průtokovém cytometru LSRII (BD Biosciences), který je součástí Centra mikroskopie ÚMG. Výsledkem byly hodnoty čelního a bočního rozptylu (FSC, resp. SSC) a fluorescence při 488 nm (GFP) a 406 nm (Hoechst) pro každou detekovanou událost.

Tyto události byly analyzovány pomocí programu FlowJo 9, ve kterém byla vybrána populace jednotlivých událostí (FSC-A:FSC-H), které měly konkrétní velikost a granularitu (FSC-A:SSC-A)

a byly negativní na Hoechst 33258 (FSC-A:406 nm). Tato populace byla označena za jednotlivé živé buňky. GFP-pozitivita těchto buněk byla zobrazena jako histogram a pomocí negativních kontrol byl definován její rozsah.

U vzorků s 1–50 % GFP-pozitivních buněk bylo možné vypočítat hypotetické množství biologicky aktivního viru aplikovaného na buňky podle vzorce:

$$T = D^{-1} \cdot V^{-1} \cdot N \cdot (-\ln(1 - F_{\text{pos}})),$$

kde T udává spočtený množství viru v IU.ml⁻¹; D ředění virového inokula; V objem, kterým bylo infikováno, v ml; N počet infikovaných buněk a F_{pos} frakci pozitivních buněk (Rainey *et al.* 2003). Vzorky s méně než 1 % GFP-pozitivních buněk byly příliš blízké pozadí a vykazovaly velký rozptyl, u vzorku s více než 50 % GFP-pozitivních buněk je výpočet zatížen příliš velkou chybou, která vede k podhodnocení množství viru.

4.2.23 Zastavení buněčného dělení

Pro zastavení buněčného dělení bylo na konfluentně narostlé misky P100 na 2 h přidáno 10 ml NP DF-1 s mitomycinem C (Sigma) v koncentraci 10 µg/ml média. Poté byly buňky třikrát opláchnuty médiem NP DF-1 a 14 hodin kultivovány v médiu NP DF-1 za standardních podmínek.

V případě, že byl buněčný cyklus zastavován infikovaným buňkám, dělo se tak 2 dny po infekci.

4.2.24 Buněčné fúze

Buněčné kultury se zastaveným buněčným cyklem byly pasážovány, spočítány a následně vysety na misky P60. Cílem bylo vytvoření směsi dvou kultur, kdy každá byla zastoupena 800 tisíci buňk. Po vizuální kontrole, že buňky přisedly na dno misek (4–6 hodin), bylo odsáto médium a na 40 s přidán roztok polyethylenglykolu (PEG) v bezsérovém DMEM zahřátý na 37 °C. Tento roztok byl předem připravený: PEG 6000 (Sigma) byl sterilizován 20 minut v Papinově hrnci, následně zchlazen na 65 °C a smíchán v poměru 1:1 s bezsérovým médiem DMEM 1× (Sigma) o stejné teplotě. Poté byly buňky třikrát opláchnuty 5 ml bezsérového DMEM a následně kultivovány v médiu NP DF-1 za standardních podmínek. Následující 4 dny bylo každý den médium odebráno a vyměněno za účelem stanovení množství produkovaného viru.

4.2.25 Software

Veškeré výpočty byly prováděny v tabulkovém procesoru Microsoft Excel. Statistické vyhodnocení rovněž proběhlo v Microsoft Excel pomocí Studentova T-testu, výsledky byly ověřeny v GraphPad Prism. Grafy v této diplomové práci byly vytvořeny v Microsoft Excel, schémata v Microsoft PowerPoint a Adobe Photoshop Elements 5.

Pro simulaci molekulárního klonování byla použita cloudová aplikace Benchling. Chromatogramy byly prohlíženy a editovány v Chromas Lite. Alignmenty byly prováděny ve Vector NTI 7 a ClustalX. Závěrečné zpracování dat do podoby publikované v této práci proběhlo v aplikaci SnapGene.

Pro analýzu dat z průtokové cytometrie bylo využito nástrojů Centra mikroskopie ÚMG, zejména FlowJo verze 9.

5. Výsledky

5.1 Blok na úrovni vstupu do buněk

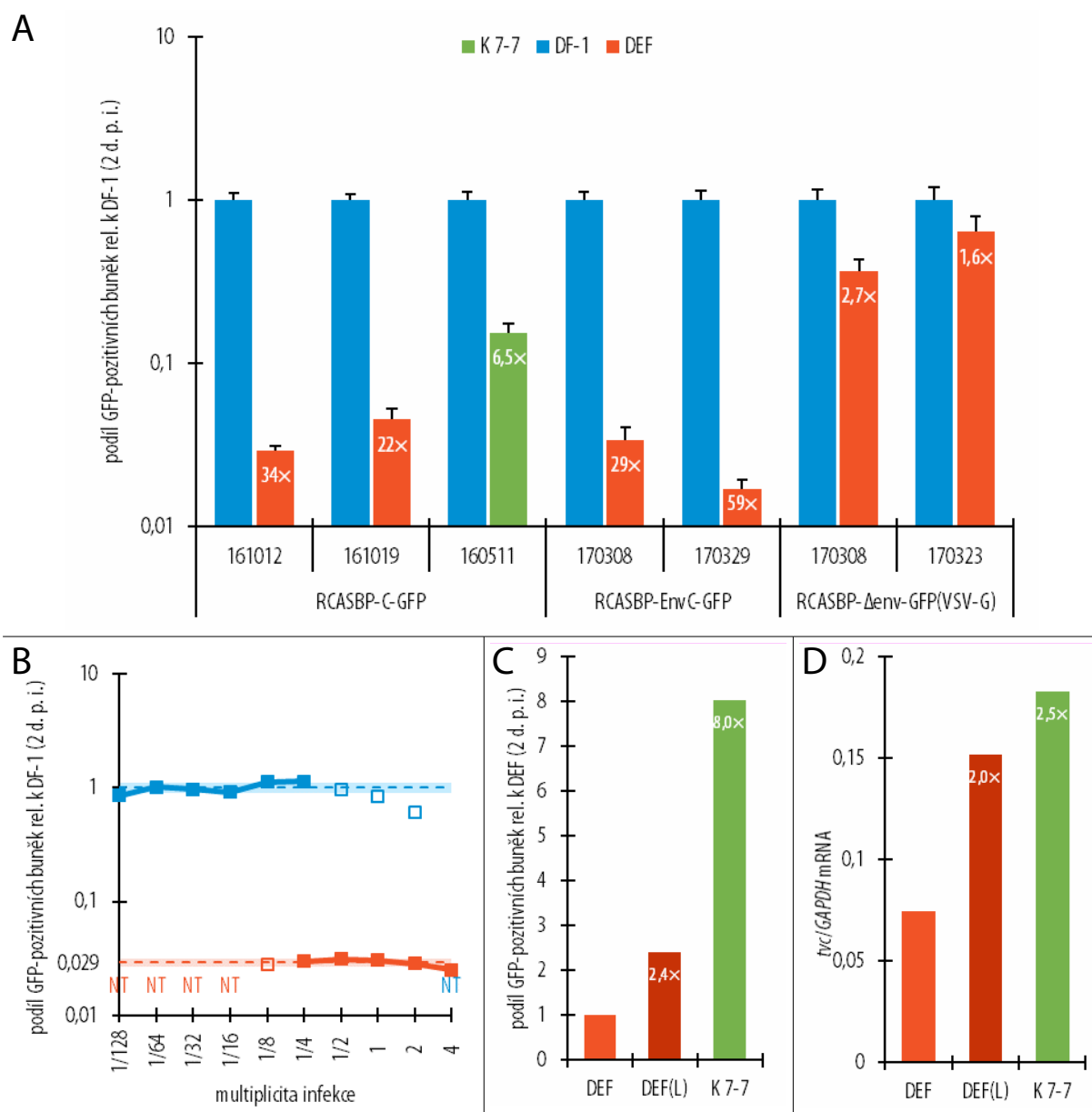
Ačkoli dokáže RSV podskupiny C kachní buňky infikovat špatně se v nich replikuje. Cílem práce bylo přesněji analyzovat tento jev. Místo RSV-C byl použit virus RCASBP-C-GFP, který ve svém genomu obsahuje fluorescenčně detekovatelný GFP. Pro ověření chování viru RCASBP-C-GFP byla měřena schopnost jeho vstupu do permissivní linie kuřecích fibroblastů DF-1 a kachních embryonálních fibroblastů. Vstup viru do buňky byl indikován cytometricky měřenou expresí GFP (obr. 7A, B). Podle očekávání jsou buňky obou druhů na virus citlivé, ale úroveň citlivosti se mezi nimi liší, virus infikuje DF-1 více než o řád účinněji než DEF. Tento výsledek potvrdil, že RCASBP-C-GFP lze v této práci použít jako model RSV-C.

Env viru RCASBP-C-GFP je rekombinantní, obsahuje SU podjednotku podskupiny C a TM podjednotku podskupiny A. Tato situace je uměle navozená, proto bylo nutné zjistit, jak se chová virus RCASBP-EnvC-GFP, který obsahuje celý EnvC. Rozdíly mezi citlivostí kachních buněk na RCASBP-C-GFP a RCASBP-EnvC-GFP nejsou velké, viry se chovají podobně (obr. 7A), což nasvědčuje defektu permissivity v kachních buňkách během časně fáze infekce.

Aby bylo možné defekt v časně fázi infekce lépe specifikovat, byly buňky infikovány replikačně defektním pseudotypovaným virem RCASBP- Δ env-GFP(VSV-G), který má na svém povrchu Env nahrazený VSV-G a může účinně vstupovat do buněk nezávisle na původním receptoru. VSV-G pseudotypovaný virus vstupuje do DEF a DF-1 téměř stejně účinně (obr. 7A), z čehož usuzujeme, že defekt v kachních buňkách souvisí s funkcí či expresí receptoru Tvc.

Dále byla testována citlivost kachní linie K 7-7 a bylo zjištěno, že virus RCASBP-C-GFP vstupuje do linie K 7-7 lépe než do DEF (7C). Podobně se citlivost zvyšovala u DEF v pozdější pasáži (DEF(L), obr. 7C) a jako možné vysvětlení se nabízela rozdílná exprese receptoru v buňkách. Pomocí qPCR bylo zjištěno, že citlivost buněk na virus opravdu může souviset s úrovní exprese *twc*, neboť se stoupající citlivostí na RCASBP-C-GFP se zvyšovala také exprese *twc* (obr. 7D).

V kachních buňkách je virová replikace omezována již během časně fáze replikačního cyklu, neboť kachní buňky vykazují sníženou citlivost vůči virům podskupiny C. Zdá se, že za tuto sníženou citlivost je zodpovědná interakce obalového glykoproteinu s Tvc a zřejmě je ovlivněná i jeho expresí.

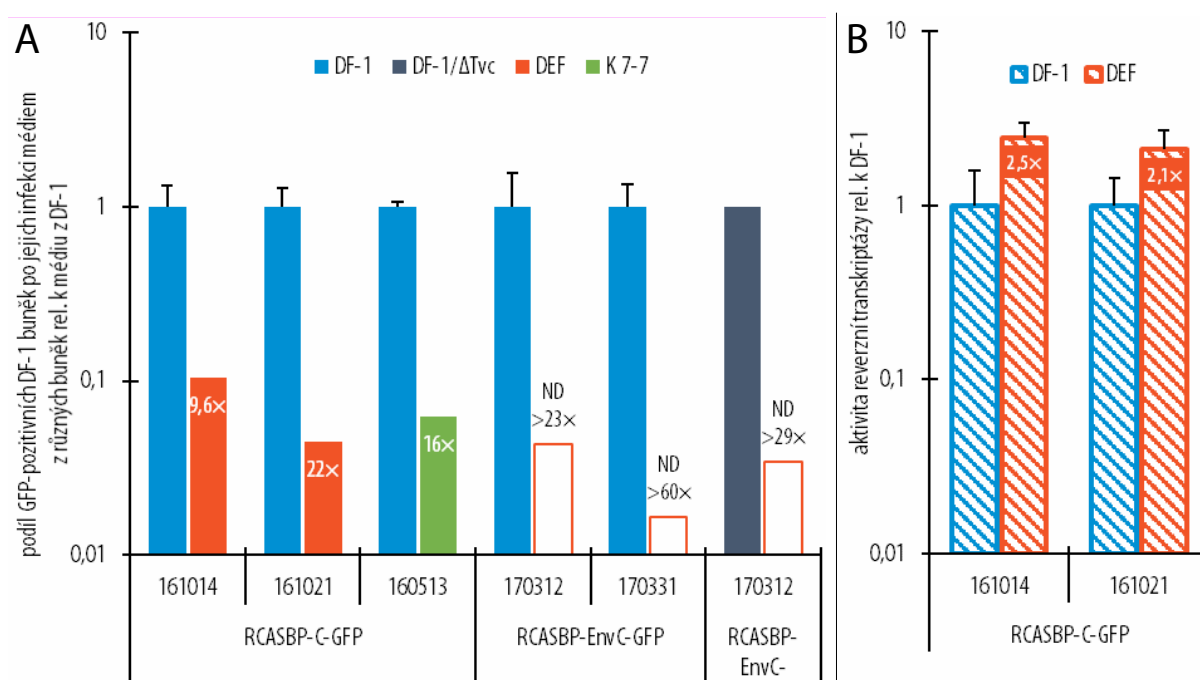


Obrázek 7 | Snížená citlivost kachních buněk k infekci RCASBP-GFP podskupiny C.

Paralelní infekce buněk DF-1 (modře), DEF (červeně) a K 7-7 (zeleně) viry RCASBP-C-GFP, RCASBP-EnvC-GFP a RCASBP-Δenv-GFP(VSV-G) byla cytometricky charakterizována jako podíl GFP-pozitivních buněk 2 dny po infekci. **A** | Souhrn výsledků pro různé viry v různých buňkách, zobrazené násobky vyjadřují pokles v kachních buňkách oproti DF-1 ve stejném experimentu. Jsou zobrazeny průměry ze 4–6 vzorků, úsečky vyjadřují směrodatné odchylky. V kachních buňkách byl podíl GFP-pozitivních buněk normalizován podle DF-1. **B** | Příklad srovnání citlivosti buněk DF-1 a DEF k infekci různou multiplicitou viru RCASBP-C-GFP. Zobrazené výsledky jsou z jednoho měření. Pro výpočet průměru (přerušované čáry) byly použity hodnoty ze vzorků, kde se podíl GFP-pozitivních buněk pohyboval v rozmezí 1–50 % (plné čtverce). Hodnoty pod 1 % a nad 50 % nebyly do výpočtu zahrnuty. V kachních buňkách byl podíl GFP-pozitivních buněk normalizován podle DF-1. NT, netestováno. **C** | Srovnání citlivosti čerstvých DEF, pozdní pasáže DEF(L) a K 7-7 na RCASBP-C-GFP. Zobrazené hodnoty jsou průměrem technických duplikátů v rámci jednoho měření, uvedené násobky vyjadřují rozdíl oproti DEF. **D** | Množství *tvc* mRNA normalizované na *GAPDH* mRNA v neinfikovaných buňkách. Zobrazeny průměry z výsledků jednoho měření v technických triplikátech.

5.2 Blok virové replikace během pozdní fáze infekce

Kromě účinnosti infekce bylo sledováno také množství virového potomstva produkovaného z infikovaných kachních buněk. Médium ze srovnatelně infikovaných buněk (stanoveno podle podílu GFP-pozitivních buněk v kultuře) bylo testováno na množství infekčního viru jeho přenesením na DF-1. Zároveň byla u vybraných vzorků stanovena aktivita reverzní transkriptázy v médiu. Rozdíly ve virové produkci byly překvapivě velké (obr. 8A), kachní buňky infikované RCASBP-C-GFP vykazují snížení produkce infekčních virionů více než o řád proti srovnatelně infikovaným DF-1. Tento pokles je stejný pro DEF i K 7-7. Také produkce infekčního viru RCASBP-EnvC-GFP z kachních buněk vykazovala pokles oproti kuřecím DF-1, který byl stejný nebo



Obrázek 8 | Snížená infektivita virionů RCASBP-GFP podskupiny C produkovaných kachními buňkami. Z paralelně infikovaných DF-1 (modře), DF-1/ΔTvc (tmavě modře), DEF (červeně) a K 7-7 (zeleně) viry RCASBP-C-GFP, RCASBP-EnvC-GFP a RCASBP-EnvC-GFP(VSV-G) bylo 2 dny po infekci odebráno médium a množství v něm obsažených virionů bylo stanoveno cytometricky na DF-1 a detekcí aktivity reverzní transkriptázy. Virová produkce kachních buněk byla normalizována na produkci kuřecích buněk. **A** | Souhrn výsledků cytometrické detekce pro různé viry produkované různými buňkami. Odebraným médiem byly infikovány DF-1 a 2 dny po infekci cytometricky charakterizovány. Výsledky byly normalizovány na promořenost buněk, ze kterých bylo médium odebíráno, zobrazené násobky vyjadřují pokles virové produkce kachních buněk oproti stejně promořeným kuřecím buňkám v rámci jednoho experimentu. Zobrazeny jsou průměry ze 4–6 vzorků naměřených v rámci jednoho experimentu z média z DF-1 a hodnota jednoho, nebo průměr dvou vzorků naměřených z média z ostatních buněk. Úsečky vyjadřují směrodatné odchylky. Podíl buněk infikovaných médiem z DEF nedosáhl v případě RCASBP-EnvC-GFP a RCASBP-EnvC-GFP(VSV-G) detekčního limitu 1 % GFP-pozitivity. ND, nedetekováno. **B** | Výsledky detekce virové produkce pomocí PERT eseje. Hodnoty aktivity reverzní transkriptázy v médiu z různě infikovaných DEF a DF-1 byly normalizovány podle ředění aplikovaného virového inokula. Zobrazeny jsou průměry 6–9 vzorků, směrodatné odchylky a násobky rozdílu mezi DEF a DF-1 v rámci jednoho experimentu.

větší v porovnání s RCASBP-C-GFP (obr. 8A) Množství reverzní transkriptázy produkované do média je však mezi DEF a DF-1 infikovanými RCASBP-C-GFP srovnatelné (obr. 8B). Pravděpodobně tedy není ovlivněna úroveň produkce virionů, ale jejich infektivita.

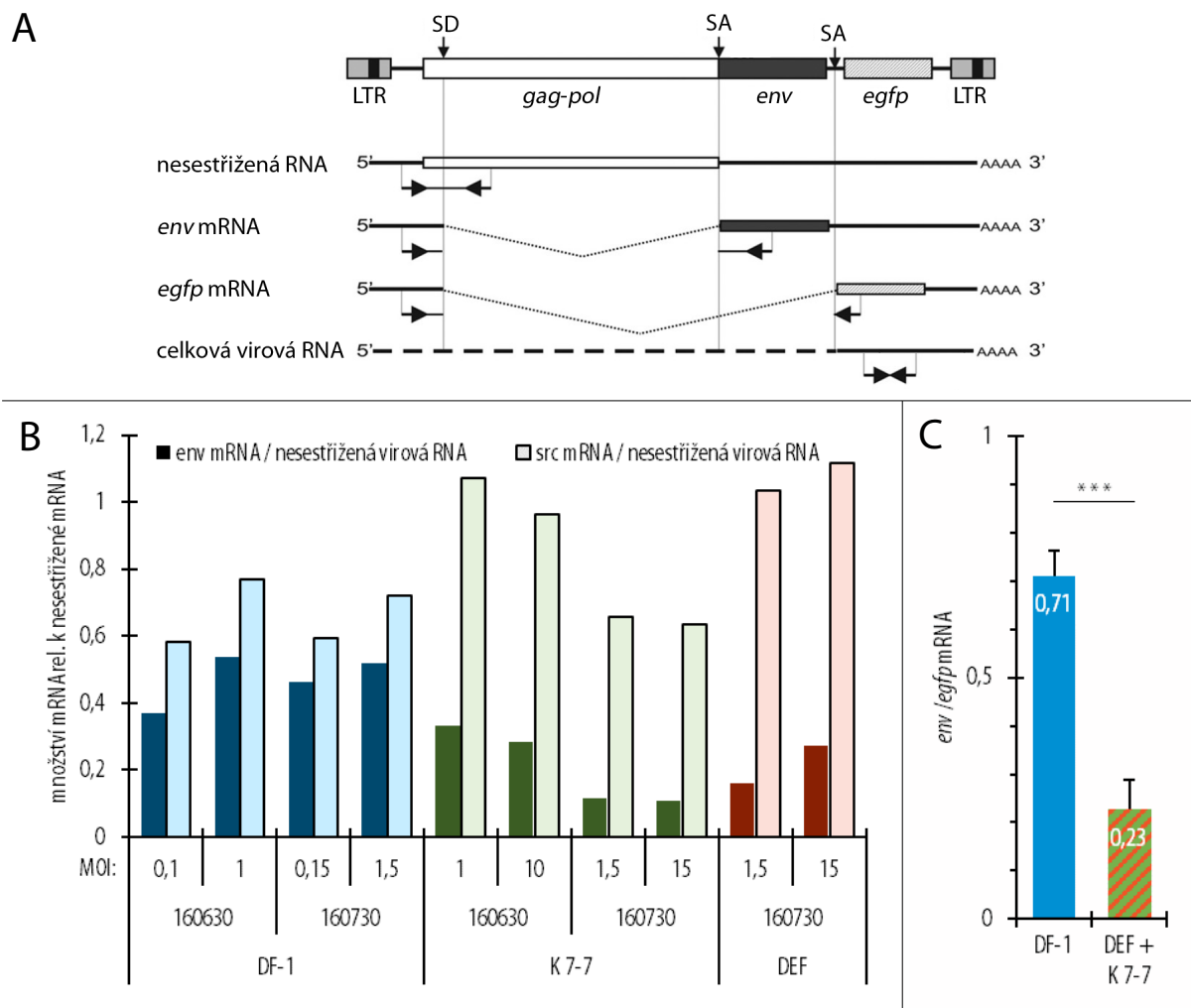
Dále jsme chtěli stanovit produkci infekčních virionů z kachních buněk po překonání bloku na úrovni vstupu do buněk. Proto byla měřena produkce pseudotypovaného replikačně kompetentního viru RCASBP-EnvC-GFP(VSV-G). Tento virus na svém povrchu nese jak EnvC, tak VSV-G, a tak je možné překonat blok na úrovni receptoru. Aby nebyly kuřecí buňky zvýhodněny přítomností funkčního receptoru pro EnvC, byla srovnávána produkce z DF-1/ Δ Tvc a DEF. Také v případě RCASBP-EnvC-GFP(VSV-G) byla produkce infekčního potomstva z kachních buněk stejná, nebo nižší, než u RCASBP-C-GFP (obr. 8A). Kvůli nižšímu titru obou použitých virů však nemohlo být dosaženo takové infekce DEF, aby buňky produkovaly detekovatelné množství infekčního viru. Snížení produkce však nastává v pozdní fázi replikačního cyklu, nezávisle na bloku na úrovni receptoru.

Pro vyloučení možného negativního vlivu endogenních alfaretrovirů na replikaci RSV v kachních buňkách byla testována cDNA z DF-1 a K 7-7 na přítomnost alfaretrovirových sekvencí pomocí PCR. Žádné takové sekvence nebyly detekovány. Také nebyl detekován infekční virus v médiu odebraném 3 dny po kotransfekci DEF pomocí pcGagPol a pAG3 (LTR- ψ -egfp-LTR). Detekce byla prováděna aplikací média na DF-1 a DEF a následným měření na průtokovém cytometru. Neinfikované DEF tedy pravděpodobně neexprimují žádný protein, který by byl schopen nahradit virový obalový glykoprotein a kompetovat o receptory na cílových buňkách.

Virová replikace je tedy blokována i v pozdní fázi infekce. Kachní buňky produkují viriony v množství odpovídajícím promořenosti kultury, ovšem jejich infektivita je snížena. Toto snížení není vyvoláno expresí endogenních strukturních proteinů alfaretrovirového původu, virové proteiny obsažené ve virionech by měly být pouze exogenního původu.

5.3 Aberantní zastoupení sestřihových forem v kachních buňkách

Pro správné zastoupení virových proteinů je zásadní správná regulace sestřihu po transkripci virové RNA (obr. 9A). Pro zjištění, zda existuje defekt na úrovni sestřihu, který by pomohl potvrdit aberantní zastoupení virových proteinů ve virionech, bylo pomocí qPCR testováno množství jednotlivých populací virových mRNA v kachních a kuřecích buňkách. Celková exprese virové RNA zhruba odpovídá míře promořenosti buněk. V kuřecích buňkách infikovaných RCASBP-C-GFP vzniká zhruba stejné množství sestřižené a nesestřižené mRNA, přičemž sestřiženou tvoří



Obrázek 9 | Pozměněné sestřihové poměry v kachních buňkách infikovaných RCASBP-C-GFP.

Z buňek DF-1 (modře), K 7-7 (zeleně) a DEF (červeně) infikovaných RCASBP-C-GFP s různou multiplicitou (MOI) byla 2 dny po infekci izolována RNA a přepsána do cDNA. Množství jednotlivých virových mRNA bylo stanoveno pomocí qPCR a specifických primerů. **A** | Schéma detekce jednotlivých RNA pomocí specifických primerů (převzato z Lounková *et al.* 2014, upraveno). **B** | Množství *env* (tmavě) a *egfp* (světle) mRNA normalizované na nesestříženou virovou RNA. Jsou znázorněny průměry z technických triplikátů ve dvou na sobě nezávislých experimentech. **C** | Sestřihové poměry mezi *env* a *egfp* mRNA v DF-1 a kachních buňkách. Zobrazena je průměrná hodnota čtyř (DF-1), resp. šesti vzorků (DEF + K 7-7) a směrodatné odchylky. $P < 0,001$.

přibližně stejný počet *env* a *egfp* mRNA (obr. 9B). V infikovaných kachních buňkách je tato rovnováha narušena ve prospěch *egfp* mRNA, která vzniká na úkor *env* mRNA (obr. 9C). Tato změna poměru *env* a *egfp* mRNA byla pozorována při různých multiplicitách infekce v DEF i linii K 7-7 (obr. 9B). Tento jev ale není tak výrazný jako v savčích buňkách a nemusí být jedinou příčinou snížené produkce infekčních virionů.

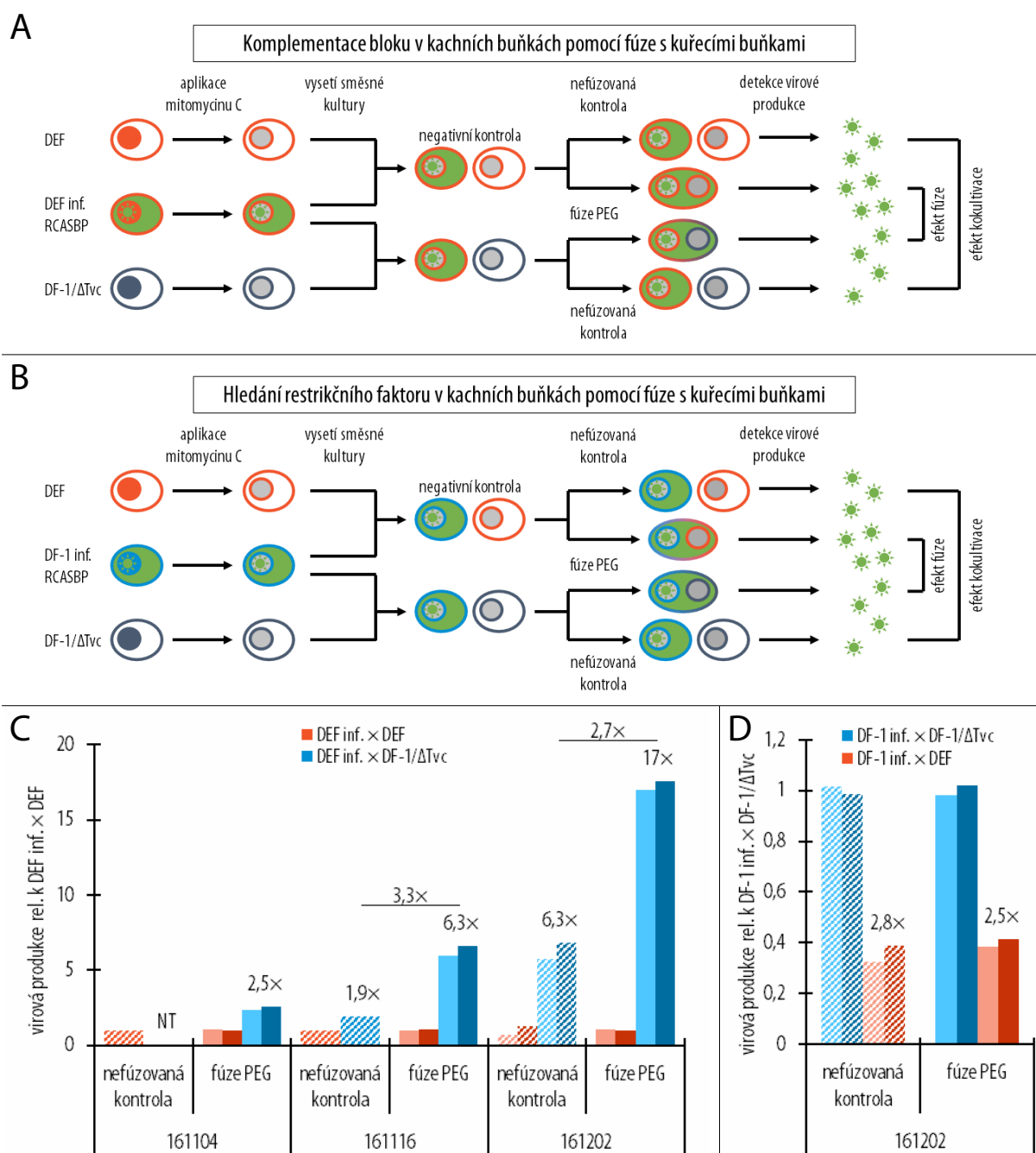
5.4 Chybějící hostitelský faktor

Pokud kachním buňkám chybí nějaký faktor, který je nutný pro úspěšnou replikaci viru, je možné takový faktor do buněk doplnit (komplementovat) pomocí buněčných fúzí. Pokud je komplementace úspěšná, dojde ke zvýšení produkce infekčního virového potomstva (obr. 10A). Stejně tak mohou fúzní experimenty prokázat i přítomnost restrikčního faktoru v kachních buňkách, který zabraňuje virové replikaci (obr. 10B). Proto byly provedeny dvě varianty fúzních experimentů, jak je znázorněno na obrázku 10A a B.

Před samotným experimentem bylo cytometricky ověřeno, že viry podskupiny C nejsou schopny infikovat DF-1/ ΔT_{vc} . Při vlastních komplementačních experimentech byl DEF infikovaným RCASBP-C-GFP s vysokou multiplicitou, neinfikovaným DEF a neinfikovaným DF-1/ ΔT_{vc} pomocí mitomycinu C zastaven buněčný cyklus. Tím bylo zabráněno jak růstu buněk (nefúzované buňky by jinak přerůstaly nedělící se heterokaryonty), tak dalšímu šíření viru v kultuře během experimentu. Buňky byly fúzovány a následně kultivovány 4 dny, během kterých bylo odebíráno médium. Množství infekčního virového potomstva bylo detekováno na DF-1 pomocí průtokové cytometrie. Byl pozorován efekt komplementace (obr. 10C), který byl však nižší, než jsme očekávali. Navíc došlo ke zvýšení virové produkce také u nefúzovaných kontrol, což může být vysvětleno parakrinní produkcí růstových faktorů kuřecími buňkami, které zvýšily přežívání infikovaných kachních buněk. Tomu nasvědčuje také fakt, že pro všechny zobrazené experimenty byla použita jedna kultura DEF, která postupně stárla a vyžadovala stále více růstových faktorů, které jim mohly dodávat buňky DF-1.

Tato hypotéza byla následně podpořena experimenty s kondiciovaným médiem. Buňky DEF a DF-1 byly infikovány virem RCASBP-C-GFP a místo čerstvého kultivačního média bylo použito médium odebrané z plně narostlých DEF a DF-1. Médium bylo před aplikací na buňky centrifugováno a filtrováno. Nejvýraznější efekt byl pozorován u DEF infikovaných s multiplicitou 10, kde byl detekován výrazně vyšší podíl infikovaných buněk kultivovaných s médiem z DF-1, než u DEF kultivovaných v čerstvém médiu. Rozdíl u nižších multiplicit nebyl tak výrazný, médium z DF-1 tedy zřejmě nezvyšuje infektivitu viru, ale pomáhá buňkám proti cytotoxickým projevům viru.

Po odečtení vlivu média způsobují fúze zhruba trojnásobné navýšení virové produkce (obr. 10C). Blok v pozdní fázi replikačního cyklu RSV je tedy vyvolaný absencí nějakého hostitelského faktoru a má recesivní charakter. Experiment byl úspěšně proveden dvakrát a bude nutné jej zopakovat s čerstvými buňkami, aby mohl být rozdíl potvrzen.



Obrázek 10 | Kuřecí buňky částečně komplementují defekt v kachních buňkách.

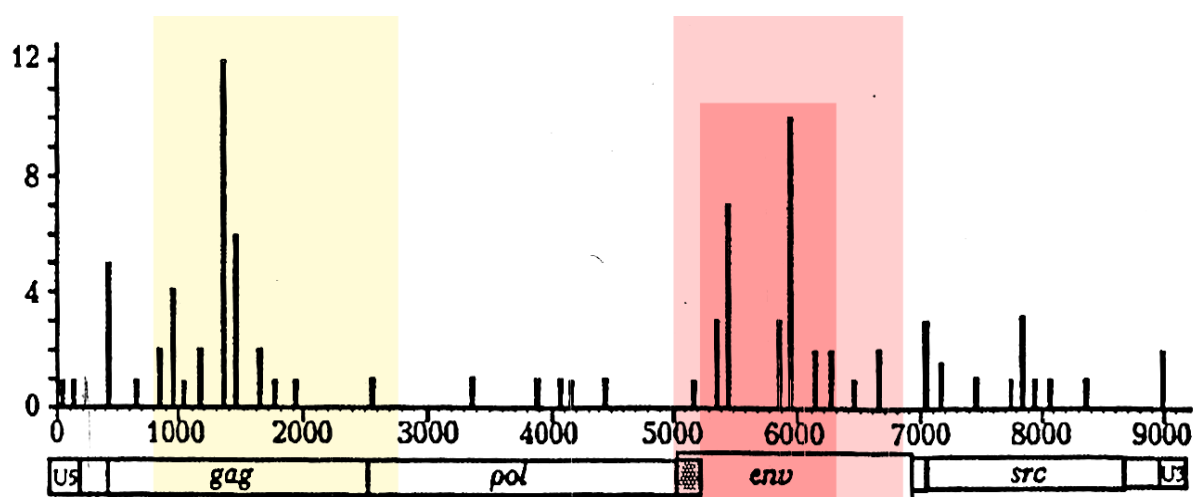
Kachní (červeně) a kuřecí (modře) buňky se zastaveným buněčným cyklem byly fúzovány polyethylenglykolem (PEG). Některé vzorky byly ponechány jako kontroly bez fúze (šrafovaně). 4 dny po fúzi bylo odebráno médium a množství infekčních virionů bylo cytometricky změřeno po infekci DF-1. **A** | Schéma experimentu, kterým byla testována komplementace virové replikace v kachních buňkách kuřecími hostitelskými faktory. **B** | Schéma experimentu, kterým byla testována restrikce virové replikace v kuřecích buňkách kachními restrikčními faktory. **C** | Výsledky komplementace. Infikované DEF byly fúzovány s neinfikovanými DEF, nebo DF-1/ΔTvc. Detekované množství infekčního viru bylo normalizováno na vzorky s infikovanými a neinfikovanými DEF. Výsledky jsou ze tří nezávislých experimentů, ve kterých bylo po 1–2 vzorcích stejné povahy. **D** | Výsledky restrikce. Infikované DF-1 byly fúzovány s neinfikovanými DF-1/ΔTvc, nebo DEF. Detekované množství infekčního viru bylo normalizováno na vzorky s infikovanými DF-1 a neinfikovanými DF-1/ΔTvc. Výsledky jednoho experimentu, který byl proveden v duplikátech. NT, netestováno.

Aby bylo možné vyloučit, že kachní buňky obsahují nějaký restriční faktor, který brání replikaci RSV, byly provedeny reciproké fúze, při kterých byly infikované DF-1 fúzovány s DEF a DF-1/ Δ Tvc. Pokus nebyl opakován, nicméně výsledky v obr. 10D naznačují, že pokud jsou kachní buňky schopny snížit virovou produkci kuřecích buněk, děje se tak opět faktorem produkovaným do média. Předpokládáme, že tento efekt je spíše vyvolaný negativním vlivem DEF na přežívání DF-1. S nejvyšší pravděpodobností tedy kachní buňky žádný restriční faktor neobsahují.

Lze tedy uzavřít, že kuřecí buňky zřejmě obsahují buněčný faktor nebo faktory, které podporují replikaci RCASBP-C-GFP. Tyto faktory, které nejsou přítomné nebo dostatečně účinné v kachních buňkách, mohou podporovat např. účinný sestřih *env* mRNA, nebo mohou působit v jiné fázi virového replikačního cyklu.

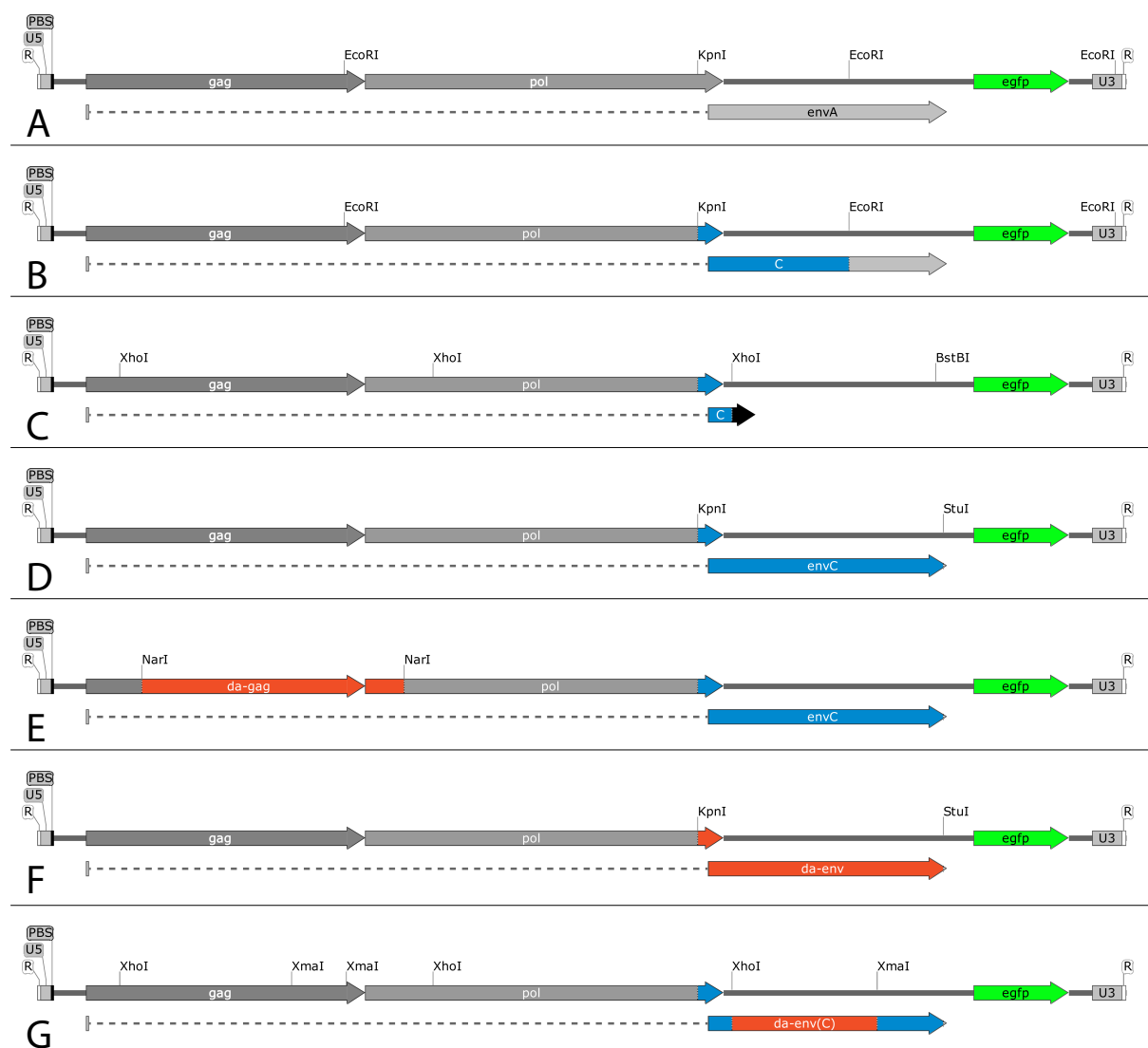
5.5 Podstata adaptace daPR-RSV-C na nového hostitele

Jelikož jsou bloky replikačního cyklu RSV v kachnách poměrně silné, jakákoliv mutace, která se ve virové populaci objeví a – byť nepatrně – virus zvýhodní, bude konzervována. Tak byl získán virus adaptovaný na kachny, daPR-RSV-C (Hložánek *et al.* 1979). Tento virus se v kachních buňkách množí výrazně účinněji než původní PR-RSV-C, ale není známo, která konkrétní fáze replikačního cyklu je ovlivněna a které mutace jsou za adaptaci přesně zodpovědné. V publikované sekvenci daPR-RSV-C (Kashuba *et al.* 1993) byly vytipovány oblasti (obr. 11), které by mohly mít vliv na virový replikační cyklus, *gag* (mutace v okolí NRS podle McNally *et al.* 1991) a *env* (oblasti



Obrázek 11 | Četnost nukleotidových záměn v daPR-RSV-C oproti PR-RSV-C. Histogram zobrazuje počet substitucí na 100 bp. Žlutě je zvýrazněna oblast obsažená v RCASBP-daGag-EnvC-GFP, růžově oblast v RCASBP-daEnv-GFP, červeně v RCASBP-daEnv(C)-GFP. Převzato z Kashuba *et al.* 1993, upraveno.

zodpovědné za receptorovou specifitu). Snažili jsme se experimentálně zjistit vliv těchto konkrétních oblastí v genech *gag* a *env* na replikaci RCASBP-EnvC-GFP v kachních buňkách.



Obrázek 12 | Schématické znázornění genomů používaných virů.

Šedou barvou jsou vyznačeny části genů pocházející z RCASBP-A-GFP, modrou z PR-RSV-C, červenou z daPR-RSV-C. Zeleně je vyznačen gen kódující GFP. **A** | RCASBP-A-GFP, tento virus byl připraven Dr. Markem Federspielem z viru SR-RSV-A náhradou *pol* oblasti sekvencí z BH-RSV a záměnou *v-src* za *egfp*, všechny následující viry jsou od něj odvozené (Federspiel & Hughes 1997). **B** | RCASBP-C-GFP, virus připravený Dr. Markem Federspielem, kombinuje SU podjednotku podskupiny C a TM podjednotku podskupiny A. **C** | RCASBP-Δenv-GFP, provirová část konstruktu použitá Danou Kučerovou a Dr. Josefem Gerykem k přípravě RCASBP-Δenv-GFP(VSV-G). Je odvozená od RCASBP-C-GFP, obsahuje několik předčasných stop-kodónů za XhoI restriktivním místem. **D** | RCASBP-EnvC-GFP, z RCASBP-A-GFP připravený Annou Lounkovou, celý Env je podskupiny C. **E** | RCASBP-daGag-EnvC-GFP, odvozený z RCASBP-EnvC-GFP náhradou *gag* oblasti. **F** | RCASBP-daEnv-GFP, odvozený z RCASBP-C-GFP, celý Env je z daPR-RSV-C. **G** | RCASBP-daEnv(C)-GFP, odvozený z RCASBP-EnvC-GFP, část Env je z daPR-RSV-C.

5.5.1 RCASBP-daGag-EnvC-GFP

Z původního daPR-RSV-C byla pomocí PCR s Phusion polymerázou namnožena oblast genů *gag* a *pol* a klonována do pGEM®-T Easy vektoru. Oblast ohraničená restrikčními místy NarI byla v plazmidu RCASBP-EnvC-GFP nahrazena sekvencí daPR-RSV-C (obr. 12E). Tím vznikl virus RCASBP-daGag-EnvC-GFP.

Kromě mutací, které byly publikovány, se mezi NarI místy vyskytuje i několik dalších, uvedených v tabulce 6. Mutace v místě ribozomálního posunu mění původní „klouzavou“ sekvenci AAAUUUA na AAUUUUA, což zřejmě bude mít negativní vliv na replikační cyklus, bylo publikováno, že tato záměna snižuje četnost posunu 5× (Jacks *et al.* 1988).

Tento plazmid je nyní připraven k transfekci do kuřecích buněk, kde bude namnožen infekční virus. Ten pak bude testován na kachních a kuřecích buňkách, zda nevykazuje menší defekt při replikaci než RCASBP-EnvC-GFP.

Tabulka 6 | Pozorované mutace oproti publikované sekvenci daPR-RSV-C mezi restrikčními místy NarI (pozice 789 a 2771). První nukleotidovou pozicí je začátek R oblasti v 5' LTR viru RCASBP-EnvC-GFP. Jako revertantní jsou označovány záměny, u kterých sekvence odpovídá PR-RSV-C. CA, kapsidový protein; NC, nukleokapsidový protein; NRS, negativní regulátor sestřihu; PR, virová proteáza. S využitím informací z Schwartz *et al.* 1983; Jacks *et al.* 1988; Kashuba *et al.* 1993; The UniProt Consortium 2017.

záměna		funkční oblast	poznámka
nukleotidová	aminokyselinová		
1013 T→C	–	p10, za NRS	revertant
1274 G→A	–	CA	revertant
1429 T→C	353 Val→Ala	CA	–
1437 T→C	356 Ser→Pro	CA	revertant
1520 C→T	–	CA	–
1535 T→C	–	CA	–
1891 A→G	507 Glu→Gly	NC, zinc-finger	revertant
2470 A→T	700 Asn→Ile	PR, frameshift sekvence	–

5.5.2 RCASBP-daEnv-GFP

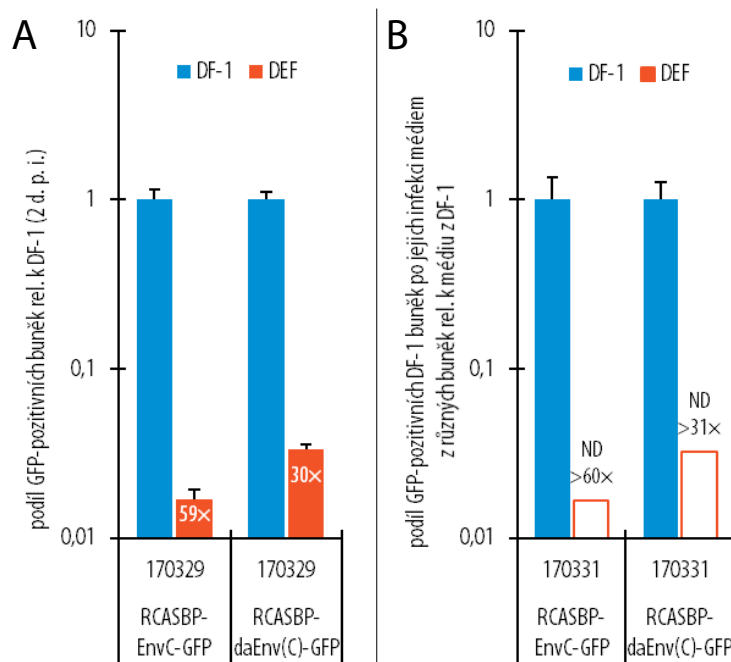
Z daPR-RSV-C byl pomocí PCR s Phusion polymerázou namnožen *env* a zaklonován do pGEM®-T Easy vektoru. Následně jím byl pomocí restrikčních endonukleáz KpnI a StuI nahrazen téměř celý *env* plazmidu RCASBP-C-GFP (obr. 12F) a vznikl plazmid RCASBP-daEnv-GFP. Sekvenací *env* oblasti byly zjištěny záměny oproti publikované sekvenci daPR-RSV-C uvedené v tabulce 7.

Tento plazmid byl transfekován do kuřecích buněk. Ačkoliv byla transfekce úspěšná, infekční virus produkován nebyl.

5.5.3 RCASBP-daEnv(C)-GFP

Vzhledem k tomu, že v původních pokusech nebyl problém s replikací daPR-RSV-C, dá se předpokládat, že defekt u RCASBP-daEnv-GFP způsobují mutace, kterými se připravený konstrukt liší od sekvence publikovaného daEnv. Nasvědčuje tomu i fakt, že se jedna z mutací nachází v oblasti, kde je štěpen signální peptid (tabulka 7). Proto bylo navrženo klonování, které umožnilo se nově vzniklým mutacím vyhnout.

Oblast *env* ohraničená restrikčními místy XhoI (5256) a XmaI (6350) byla v plazmidu RCASBP-EnvC-GFP nahrazena stejnou oblastí kachnám adaptovaného *env*. Vzniklý plazmid RCASBP-daEnv(C)-GFP (obr. 12G) tedy obsahuje začátek a konec EnvC, mezi kterými je sekvence daEnv.



Obrázek 13 | Defekty v replikaci RCASBP-daEnv(C)-GFP.

Buňky DF-1 (modře) a DEF (červeně) byly paralelně infikovány virem RCASBP-EnvC-GFP a RCASBP-daEnv(C)-GFP s různou multiplicitou. Hodnoty DEF byly normalizovány na DF-1. **A** | Promořenost buněk 2 dny po infekci měřená průtokovou cytometrií. Znáznorněny jsou průměry z 5–6 vzorků, úsečky vyjadřují směrodatnou odchylku. **B** | Množství infekčních virionů v médiu 2 dny po infekci detekované cytometricky po infekci DF-1. Výsledky byly normalizovány na promořenost buněk, ze kterých bylo odebíráno médium. Průměrná produkce z DF-1 byla vypočtena z 5–6 vzorků, úsečky vyjadřují směrodatnou odchylku. Podíl buněk infikovaných médiem z DEF nedosáhl detekčního limitu 1 % GFP-pozitivity. ND, nedetekováno.

Tímto plazmidem byly transfekovány kuřecí buňky, které produkovaly infekční virus. Viry RCA-SBP-daEnv(C)-GFP a RCASBP-EnvC-GFP byly paralelně infikovány kachní a kuřecí buňky. V případě viru RCASBP-daEnv(C)-GFP bylo pozorováno nepatrné zvýšení účinnosti vstupu do buněk, virová produkce bohužel nebyla detekována ani u jednoho viru (obr. 13A, B).

Mutace v oblasti Env viru daPR-RSV-C (vyznačené červeně na obr. 11) tedy nehrají zásadní roli při popsaném zvýšení účinnosti replikace adaptovaného viru v kachních buňkách. Pro definitivní potvrzení je nutné připravit celý daPR-RSV-C kódující GFP jako pozitivní kontrolu chování původního viru.

Tabulka 7 | Pozorované mutace oproti publikované sekvenci daPR-RSV-C mezi restrikčními místy KpnI (pozice 4997) a StuI (pozice 6852). Žádná ze záměn není obsažená v RCASBP-daEnv(C)-GFP. První nukleotidovou pozicí je začátek R oblasti v 5' LTR viru RCASBP-EnvC-GFP. TM, transmembránová podjednotka obalového glykoproteinu. S využitím informací z Kashuba *et al.* 1993; The UniProt Consortium 2017.

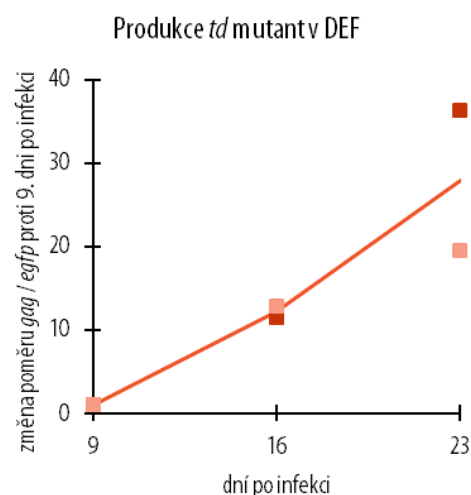
záměna		funkční oblast
nukleotidová	aminokyselinová	
5244 G→A	63 Asp→Asn	místo štěpení signální peptidázou
6456 G→A	467 Asp→Asn	extracelulární část TM
6573 T→A	506 Tyr→Asn	extracelulární část TM

5.6 Vznik transformačně defektních mutant RSV v kachních buňkách

Jedním z mechanismů, kterými RSV zjednodušuje svůj cyklus v cizím hostiteli, je ztráta schopnosti akutně transformovat hostitelské buňky. Delece v-*src* z virového genomu pomáhá viru na několika úrovních – zkracuje virový genom (a usnadňuje jeho enkapsidaci), posiluje sestřihový akceptor pro *env* a vede k pomalejším a skrytějším infekcím. Tvorba *td* RSV mutant byla v kachních pozorována, nebyl však dosud proveden experiment, ve kterém by byla sledována ztráta *egfp* z virového genomu.

Proto byly v dlouhodobém experimentu infikovány kachní buňky a pozorováno šíření viru pod fluorescenčním mikroskopem. Dvakrát týdně byly buňky pasážovány a jejich část byla sklizena lyzační metodou. V lyzovaných buňkách pak bylo detekováno množství virové DNA pomocí primerů specifických pro *gag* a pro *egfp*. Obrázek 14 ukazuje předběžný výsledek tohoto experimentu, který zatím nebyl zopakován.

V kachních buňkách se velmi rychle vytváří *td* mutanty i u virů systému RCAS. *td* RCASBP-C-GFP, který neobsahuje *egfp*, se zřejmě replikuje mnohem efektivněji a brzy začíná převládat nad původním virem.



Obrázek 14 | Zvyšující se množství *td* provirů v kachních buňkách infikovaných RCASBP. DEF byly infikovány RCASBP-C-GFP s multiplicitou 1 a dvakrát týdně pasážovány. V čase 9, 16 a 23 dní po infekci byly z části buněk připraveny lyzáty pro qPCR se specifickými primery na *gag* a *egfp*. Ze získaných hodnot byly spočítány poměry *gag/egfp* a normalizovány vůči vzorkům odebraným 9. den. Výsledky jsou z jednoho experimentu, který byl proveden v duplikátu. Čtverce zobrazují vypočtené hodnoty průměru technických (qPCR) duplikátů každého ze vzorků, plná čára spojuje jejich průměry.

6. Diskuze

Virus Rousova sarkomu byl a stále zůstává modelovým retrovirem. Jako prvním objevenému retroviru mu byla věnována značná pozornost a dodnes patří mezi nejprostudovanější zástupce této skupiny virů. Ačkoli se jedná o tzv. jednoduchý retrovirus bez akcesorních regulačních genů, stále přesně nevíme, jakým způsobem jsou jednotlivé kroky jeho replikačního cyklu regulovány.

Celá řada prací zkoumala vztah viru se svým přirozeným hostitelem, výsledky z chování v cizodruhových hostitelích pocházejí zejména od týmů kolem Jana Svobody (shrnutí v Svoboda 2016). Jeho cílem bylo zjistit, co určuje permisivitu dané buňky vůči viru, a jestli a jak virus dokáže tyto odlišnosti překonat. Podobné otázky byly nastoleny při hledání původu HIV (McClure & Schulz 1989).

Přirozeným hostitelem RSV je kur domácí, tato práce zkoumá virovou replikaci v kachnách divokých. Kuřata patří do řádu hrabavých ptáků (Galliformes), kachny do řádu vrubozobých (Anseriformes). Oba řády vytvářejí společný nadřád Galloanserae, jehož zástupci jsou rozšíření po celém světě (Eo *et al.* 2009). Poslední společný předek vrubozobých a hrabavých žil zhruba před 70–100 miliony let (Haddrath & Baker 2001). Kachny jsou vůči RSV semipermisivní, virus je schopen do jejich buněk vstoupit, ale jeho replikace je značně omezená. Kachní model tak představuje určitý kompromis mezi permisivitou přirozeného hostitele a nepermisivitou savčích buněk.

Kachny jsou susceptibilní pouze k ASLV podskupiny C, které pro svůj vstup využívají receptor Tvc (Elleder *et al.* 2005). Jedná se o butyrophilin (butyrophilin, subfamily 1 member A1), což je transmembránový protein z imunoglobulinové superrodiny, který má dvě extracelulární domény, IgV a IgC. Výsledky uvedené v této práci nepřímo ukazují, že rozpoznání kachního receptoru virem není účinné. Aminokyselinové sekvence kachního a kuřecího Tvc jsou shodné ze 70 %, sekvence domény IgV, se kterou virus interaguje, je zobrazena na obrázku 15. Je pravděpodobné, že kachní Tvc má nižší afinitu k virovému obalovému glykoproteinu. Tomu nasvědčuje i vzrůstající citlivost kachních buněk při zvýšené expresi kachního Tvc, což nebylo v případě kuřecího receptoru pozorováno, EnvC se na kuřecí Tvc váže velmi efektivně i při malých koncentracích (Elleder *et al.* 2005). Kachní buňky také mohou exprimovat různé izoformy Tvc. Nelze ani vyloučit, že pro vstup viru je nutný koreceptor, který dosud nebyl popsán.

kur domácí	34	FSVQGPPDPVAVAVGQDVVLPCHLSPEQSVQHMEVMWFRDQFTPFVHRYRDGQDHYG	90
kachna divoká		FSVKGPPDPVAVAVGQDVVLPCHVSPAQSVQDMEVTWFRQFTPFVHRYKDRQDQYG	
kur domácí	101	DQELRYQGRTEMLKDGLANGSVSLRIFRVQLSDRGYTCIVRSDLGYDEAVVELKVT	147
kachna divoká		DQMVQYQGRTELLKDSLITNGSVDLRIFRVQLSDKGLYTCTFVRSDSGYDEAVVELKVT	

Obrázek 15 | Srovnání aminokyselinové sekvence domény IgV kuřecího a kachního Tvc. Šedě jsou zvýrazněny neshodné aminokyseliny. (Uniprot ID: Q49K83, resp. R0LUY2.)

Pro překonání bloku na úrovni receptoru byly použity viry pseudotypované pomocí VSV-G, což by mělo maximalizovat účinnost vstupu viru do většiny buněk včetně kachních fibroblastů (shrnutí v Yee *et al.* 1994). Nehledě na to však úroveň infekce kuřecích a kachních buněk nedosáhla zcela stejných hodnot (obr. 7A). Rozdíl je však malý a může být způsobený experimentální nepřesností. Výsledky mohou být také mírně ovlivněny rychlostí přisedání buněk a jejich rozdílnou velikostí.

Blok ve virové replikaci v kachních buňkách byl pozorován také v pozdní fázi při produkci infekčních virionů. Rozdíl mezi virovou produkcí kachních a kuřecích buněk činí více než jeden řád a je stejný u DEF i u immortalizované linie K 7-7 (obr. 8A).

Zajímavé je, že aktivita reverzní transkriptázy v médiu sebraném z infikovaných kachních buněk neodpovídá virovému titru, který byl následně odhadován na DF-1 pomocí průtokové cytometrie (obr. 8A). Aktivita reverzní transkriptázy spíše odpovídá proinfikovanosti buněk (obr. 8B), tudíž se zdá, že DEF produkují stejné množství virových částic jako DF-1, ale tyto partikule jsou méně infekční. Abychom tuto hypotézu potvrdili, plánujeme stanovit množství proteinu Gag v médiu, které by mělo odpovídat aktivitě reverzní transkriptázy a tudíž by u stejně infikovaných DEF a DF-1 mělo být stejné.

Je také možné, že částice infekční jsou, ale detekovaný titr není přesný kvůli delecí fluorescenčního markeru *egfp* z virového genomu. Bylo publikováno, že v kachních buňkách dochází k poměrně rychlé tvorbě transformačně defektních variant, které ztrácejí nestrukturní gen (Shimakage *et al.* 1979). Výsledky této práce potvrzují zmíněný jev i u virového vektoru RCASBP-C-GFP (obr. 14). Přesto není pravděpodobné, že by ke ztrátě *egfp* došlo, již 2 dny po infekci (přibližně po jednom replikačním cyklu). Virové varianty bez *egfp* byly detekovány až zhruba po týdně od infekce.

Fúzními experimenty byla vyloučena přítomnost restrikčního faktoru v kachních buňkách, který by se mohl inkorporovat do virionů a negativně ovlivňovat replikační cyklus viru (obr. 10D).

I proto se jako nejpravděpodobnější vysvětlení semipermissivity kachních buněk pro viry podskupiny C jeví nedostatečné množství Env molekul na povrchu virionů.

Tomu nasvědčuje i změna sestřihových poměrů virové RNA v kachních buňkách (obr. 9), vzniká více *egfp* mRNA než *env* mRNA. Zdá se, že sestřihový akceptor před *egfp* je lépe rozpoznáván. Podobně (tedy v neprospěch *env* mRNA) je ovlivněn sestřih v nepermissivních savčích buňkách, které žádný virus neprodukují. V savčích buňkách ale také vzniká aberantně sestřižená mRNA na úkor *env* mRNA (Lounková *et al.* 2014), jejíž přítomnost v kachních buňkách nebyla testována. Ačkoli transformace buněk pomocí v-Src virus zvyšuje, není pro jeho replikaci esenciální. U virů kódujících GFP k žádnému zvýhodnění nedochází, pokud navíc vzniká nestrukturní protein na úkor Env, je virová replikace omezená. Na rozdíl od savčích buněk není sestřih *env* mRNA v kachních buňkách potlačen úplně, zatím nebylo zjištěno, jak se změny projevují na proteinové úrovni. Myslíme si, že množství Env je nedostatečné a omezuje infektivitu vznikajících virionů, tuto hypotézu je ještě nutné potvrdit. Proto byly provedeny imunofluorescenční experimenty se značením proteinu Env v nativní konformaci na povrchu fixovaných buněk pomocí solubilního Tvc konjugovaného s myším IgG (Elleder *et al.* 2005) a barvením sekundární fluorescenčně značenou protilátkou, ale pomocí průtokové cytometrie se Env nepodařilo detekovat. Také imunofluorescenční barvení sklíček s fixovanými buňkami nebylo úspěšné, zvolený systém detekce Env nebyl dostatečně specifický. Později byly získány protilátky proti C-koncovému peptidu TM (Mothes *et al.* 2000), které rozpoznávají také denaturovanou formu EnvC. Nyní jsou připraveny vzorky na analýzu pomocí metody Western blot s použitím této protilátky.

Pomocí buněčných fúzí jsme se snažili zjistit, zda v kachních buňkách chybí nějaký faktor nutný pro úspěšnou virovou replikaci, který by byl pomocí fúze s kuřecími buňkami komplementován. K infekcím před fúzními experimenty byly použity větší objemy virového inokula s cílem maximalizovat podíl infikovaných buněk. V jednotlivých experimentech se tento podíl mírně lišil a rozdílná byla i produkce infekčního virového potomstva. Součástí každého z experimentů ale byly kontrolní vzorky, vůči kterým bylo možné hodnoty vztáhnout. Navýšení virové produkce kachních buněk po fúzi s kuřecími buňkami bylo pozorované vždy, ale jeho míra se lišila. Ze třech experimentů je možné vysledovat trend vzrůstajícího efektu kokultivace s DF-1, který si vysvětlujeme stárnutím kultury DEF. Samotný efekt komplementace je poměrně malý, tento výsledek je ale závislý na efektivitě fúzí. Použité kachní buňky bohužel vykazují morfologii, která ztěžuje rozpoznání heterokaryontů pomocí mikroskopie a vyhodnocení účinnosti fúzí. Dominantní efekt

komplementace je ale z grafů jasně patrný, ačkoli není tak silný jako v savčích buňkách, ve kterých je defekt ve virové replikaci závažnější.

Tyto výsledky potvrzují, že defekt v kuřecích buňkách není jen na úrovni vstupu, ale také při produkci infekčních částic. Myslíme si, že tento blok je zapříčiněn absencí kuřecího faktoru nutného pro optimální sestřih *env* mRNA. Pravděpodobně zde chybí stejný faktor, jako v savčích buňkách, čemuž nasvědčuje i fakt, že kachní buňky, na rozdíl od kuřecích, nejsou schopny komplementovat defekt ve virové replikaci PR-RSV-C v savčích buňkách (Hložánek *et al.* 1979; Lounková, nepublikováno). Zajímavé je, že ke komplementaci defektu v křeččí RSCh linii transformované SR-RSV-D po její fúzi s DEF dochází (Hložánek *et al.* 1979).

Tím, že je virus schopen alespoň v malé míře replikace v kachních buňkách, dochází k mutacím ve virovém genomu (Zarling & Temin 1975). Velká část z nich je náhodná a nijak nezvýhodňuje virus. Virové genomy velmi rychle divergují, protože chybovost reverzní transkriptázy v replikačním cyklu RSV je vysoká, 10^{-3} – 10^{-4} (Coffin *et al.* 1980). Jestliže se ale objeví mutace, které zlepšují replikaci viru, jsou pozitivně selektovány a dochází k adaptaci na nového hostitele. V případě adaptace RSV podskupiny B na replikaci v křepelčích buňkách byly tyto mutace popsány v oblasti proteinu Env, který je zodpovědný za rozpoznání receptoru (Rainey *et al.* 2003). V případě kachních buněk se zdá, že k adaptaci může docházet dvěma způsoby. Bylo pozorováno, že v kachních buňkách se velmi rychle vytváří *td* varianty RSV (Shimakage *et al.* 1979) a takto mutovaný virus se v kachních buňkách množí téměř stejně účinně jako v kuřecích buňkách (Geryk *et al.* 1980). Domníváme se, že vzniklé *td* mutanty dokážou díky absenci *v-src* překonat defektní sestřih RSV v kachních buňkách a zřejmě účinně produkovat *env* mRNA.

Byl ale také popsán virus adaptovaný na kachny (daPR-RSV-C), který si zachoval transformační aktivitu, ale ve svém genomu naakumuloval značné množství mutací (Hložánek *et al.* 1979; Kashuba *et al.* 1993). Kachní buňky sice nedokážou komplementovat defekt replikačního cyklu v savčích buňkách infikovaných PR-RSV-C, ale komplementují defekt replikačního cyklu viru daPR-RSV-C v křeččích buňkách (Hložánek *et al.* 1992). Z toho se dá usuzovat, že mutace v sekvenci daPR-RSV-C umožňují interakci s některým z kachních hostitelských faktorů, jehož doplnění pak dokáže překonat replikační defekt v savčích buňkách.

Myslíme si, že tento „komplementující“ hostitelský faktor se podílí na sestřihu, ale sekvence daPR-RSV-C tomu příliš nenasvědčuje (Kashuba *et al.* 1993). Obsahuje mutace v NRS, nicméně se nenacházejí v nejdůležitějších regulačních oblastech (McNally *et al.* 1991). V blízkosti sestři-

hových míst ani ESE mutace nejsou (Katz & Skalka 1990), tři mutace jsou před koncem vlásenky SSS, ale zřejmě nemají vliv na její funkční část (McNally & Beemon 1992).

Podarilo se nám získat virový konstrukt, který měl obsahovat publikovanou sekvenci daPR-RSV-C (Kashuba *et al.* 1993). Bohužel neznáme přesný původ tohoto konstruktu a jeho sekvence úplně neodpovídá publikované sekvenci. Nevíme, kdy byly nové mutace do sekvence zavedeny, každopádně ze tří nových mutací v *env* jedna znemožňuje replikaci viru, zbylé dvě nahrazují původní aminokyseliny asparaginem a vytvářejí potenciální glykosylační místa (Asn-Xaa-Ser/Thr). Jelikož nejvíce mutací podle Kashuby *et al.* (1993), které by mohly být zodpovědné za adaptaci na kachny, je ve dvou oblastech genomu, *env* a *gag*, rozhodli jsme se otestovat jejich vliv na replikaci RCASBP-EnvC-GFP.

Podarilo se připravit zatím pouze jeden virus, který obsahuje publikované mutace v *env*. Vliv těchto mutací na replikační cyklus RCASBP-EnvC-GFP je téměř zanedbatelný a je nepravděpodobné, že by tyto mutace měly vliv na adaptaci na kachní buňky. Abychom naše pozorování ještě potvrdili, připravuje Volodymyr Stepanets bezreceptorové (Tvc negativní) kuřecí buňky se stabilně transfekovaným kachním, nebo kuřecím receptorem Tvc. Jelikož mutace v *env* by měly mít vliv především na interakci s buněčným receptorem, bude tento systém nejvhodnější pro otestování této virové mutanty. Virový konstrukt nesoucí mutace v oblasti *gag* byl již připraven, ale nebyl otestován v tkáňových kulturách.

Ačkoliv námi zvolený modelový systém je značně vzdálený situaci ve volné přírodě, kde se RSV téměř nevyskytuje, tato práce přináší nová zjištění. Snaží se poukázat na možné bloky ve virové heterotransmisi a způsoby adaptace viru na cizodruhového hostitele. V neposlední řadě nám tento výzkum může pomoci k odhalení kuřecích faktorů nutných pro replikaci RSV.

7. Souhrn

Tato práce se zaměřuje na podstatu semipermissivity kachních buněk vůči viru Rousova sarkomu.

Byly učiněny následující závěry:

- Replikační cyklus RSV v kachních buňkách je blokován na více úrovních.
- První defekt je způsoben suboptimálním receptorem, který snižuje účinnost vstupu do buněk více než o řád.
- Druhým defektem je nedostatečná syntéza virového obalového glykoproteinu, která je vyvolaná už na úrovni sestřihu mRNA.
- Množství virionů produkovaných kachními buňkami odpovídá jejich promořenosti, ale infektivita virionů je více než o řád snížena.
- Blok v kachních buňkách má recesivní charakter a může být komplementován pomocí fúzí s permisivními buňkami.
- V kachních embryonálních fibroblastech chybí některý z hostitelských faktorů nutných pro účinnou replikaci RSV.
- Kachní embryonální fibroblasty neobsahují restriční faktory proti RSV.
- Adaptace viru na kachního hostitele není vyvolaná mutacemi v obalovém glykoproteinu.
- Vektory systému RCAS ztrácejí v kachních velmi rychle vnášený nestrukturní gen.

8. Seznam použité literatury

- Adams, S. E., Mellor, J., Gull, K., Sim, R. B., Tuite, M. F., Kingsman, S. M. & Kingsman, A. J., 1987. The functions and relationships of Ty-VLP proteins in yeast reflect those of mammalian retroviral proteins. *Cell*, 49(1), s.111–119.
- Alexander, F., Leis, J., Soltis, D. A., Crowl, R. M., Danho, W., Poonian, M. S., Pan, Y. C. & Skalka, A. M., 1987. Proteolytic processing of avian sarcoma and leukosis viruses pol-endo recombinant proteins reveals another pol gene domain. *Journal of virology*, 61(2), s.534–542.
- Atkins, J. F., Loughran, G., Bhatt, P. R., Firth, A. E. & Baranov, P. V., 2016. Ribosomal frameshifting and transcriptional slippage: From genetic steganography and cryptography to adventitious use. *Nucleic Acids Research*, 44(15), s.7007–7078.
- Avibase, 2017. The world bird database. Available at: <http://avibase.bsc-eoc.org> [Viděno duben 15, 2017].
- Benson, S. J., Ruis, B. L., Fadly, A. M. & Conklin, K. F., 1998. The unique envelope gene of the subgroup J avian leukosis virus derives from ev/J proviruses, a novel family of avian endogenous viruses. *Journal of virology*, 72(12), s.10157–10164.
- Benton, W. J., Cover, M. S. & Krauss, W. C., 1962. The incidence of avian leukosis in broilers at processing. *Avian Diseases*, 6(4), s.430.
- Berberich, S. L., Macias, M., Zhang, L., Turek, L. P. & Stoltzfus, C. M., 1990. Comparison of Rous sarcoma virus RNA processing in chicken and mouse fibroblasts: evidence for double-spliced RNA in nonpermissive mouse cells. *Journal of virology*, 64(9), s.4313–4320.
- Bova, C. A., Manfredi, J. P. & Swanstrom, R., 1986. env Genes of avian retroviruses: Nucleotide sequence and molecular recombinants define host range determinants. *Virology*, 152(2), s.343–354.
- Bova, C. A., Olsen, J. C. & Swanstrom, R., 1988. The avian retrovirus env gene family: molecular analysis of host range and antigenic variants. *Journal of virology*, 62(1), s.75–83.
- Broome, S. & Gilbert, W., 1985. Rous sarcoma virus encodes a transcriptional activator. *Cell*, 40(3), s.537–546.
- Burt, D. W., Carré, W., Fell, M., Law, A. S., Antin, P. B., Maglott, D. R., Weber, J. a, Schmidt, C. J., Burgess, S. C. & McCarthy, F. M., 2009. The chicken gene nomenclature committee report. *BMC Genomics*, 10(Suppl 2), s.S5.
- Butan, C., Winkler, D. C., Heymann, J. B., Craven, R. C. & Steven, A. C., 2008. RSV capsid polymorphism correlates with polymerization efficiency and envelope glycoprotein content: implications that nucleation controls morphogenesis. *Journal of molecular biology*, 376(4), s.1168–1181.
- Cabello-Villegas, J., Giles, K. E., Soto, A. M., Yu, P., Mougin, A., Beemon, K. L. & Wang, Y.-X., 2004. Solution structure of the pseudo-5' splice site of a retroviral splicing suppressor. *RNA (New York, N. Y.)*, 10(9), s.1388–1398.
- Coffin, J. M., Tschlis, P. N., Barker, C. S., Voynow, S. & Robinson, H. L., 1980. Variation in avian retrovirus genomes. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 354(1), s.410–425.

- Collett, M. S. & Erikson, R. L., 1978. Protein kinase activity associated with the avian sarcoma virus src gene product. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 75(4), s.2021–2024.
- Craven, R. C., Bennett, R. P. & Wills, J. W., 1991. Role of the avian retroviral protease in the activation of reverse transcriptase during virion assembly. *Journal of virology*, 65(11), s.6205–6217.
- Cui, J., Zhao, W., Huang, Z., Jarvis, E. D., Gilbert, M. T.P., Walker, P. J., Holmes, E. C. & Zhang, G., 2014. Low frequency of paleoviral infiltration across the avian phylogeny. *Genome Biology*, 15(12), s.539–551.
- Cui, N., Su, S., Chen, Z., Zhao, X. & Cui, Z., 2014. Genomic sequence analysis and biological characteristics of a rescued clone of avian leukosis virus strain JS11C1, isolated from indigenous chickens. *Journal of General Virology*, 95(Pt_11), s.2512–2522.
- Desai, T. M., Marin, M., Mason, C. & Melikyan, G. B., 2017. pH regulation in early endosomes and interferon-inducible transmembrane proteins control avian retrovirus fusion. *The Journal of biological chemistry*, s.jbc.M117.783878.
- Dorner, A. J., Stoye, J. P. & Coffin, J. M., 1985. Molecular basis of host range variation in avian retroviruses. *Journal of virology*, 53(1), s.32–39.
- Duran-Reynals, F., 1942. The reciprocal infection of ducks and chickens with tumor-inducing viruses. *Cancer Research*, 2(5), s.343–369.
- Elleder, D., Stepanets, V., Melder, D. C., Šenigl, F., Geryk, J., Pajer, P., Plachý, J., Hejnar, J., Svoboda, J. & Federspiel, M. J., 2005. The receptor for the subgroup C avian sarcoma and leukosis viruses, Tvc, is related to mammalian butyrophilins, members of the immunoglobulin superfamily. *Journal of virology*, 79(16), s.10408–10419.
- Eo, S. H., Bininda-Emonds, O. R.P. & Carroll, J. P., 2009. A phylogenetic supertree of the fowls (Galloanserae, Aves). *Zoologica Scripta*, 38(5), s.465–481.
- Fábryová, H., Hron, T., Kabičková, H., Poss, M. & Elleder, D., 2015. Induction and characterization of a replication competent cervid endogenous gammaretrovirus (CrERV) from mule deer cells. *Virology*, 485, s.96–103.
- Fadly, A. M., Schat, K. A., Nair, V., Zavala, G., Witter, R. L., Hafner, S., Goodwin, M. A. & Reece, R. L., 2008. Neoplastic diseases. In Y. M. Saif, ed. *Diseases of poultry*. Blackwell Publishing Professional, s. 449–618.
- Federspiel, M. J. & Hughes, S. H., 1997. Retroviral gene delivery. In *Methods Cell Biol.* s. 179–214.
- Ficht, T. A., Chang, L. J. & Stoltzfus, C. M., 1984. Avian sarcoma virus gag and env gene structural protein precursors contain a common amino-terminal sequence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 81(2), s.362–366.
- Fogel, B. L., McNally, L. M. & McNally, M. T., 2002. Efficient polyadenylation of Rous sarcoma virus RNA requires the negative regulator of splicing element. *Nucleic acids research*, 30(3), s.810–817.
- Fritsch, E. F. & Temin, H. M., 1977. Inhibition of viral DNA synthesis in stationary chicken embryo fibroblasts infected with avian retroviruses. *Journal of virology*, 24(2), s.461–469.

- Garten, W., Hallenberger, S., Ortmann, D., Schäfer, W., Vey, M., Angliker, H., Shaw, E. & Klenk, H. D., 1994. Processing of viral glycoproteins by the subtilisin-like endoprotease furin and its inhibition by specific peptidylchloroalkylketones. *Biochimie*, 76(3–4), s.217–225.
- Geryk, J., Mazo, A., Svoboda, J. & Hložánek, I., 1980. Replication of transformation-defective mutants of the Prague strain of Rous sarcoma virus and isolation of a td mutant from duck-adapted PR-RSV-C. *Folia Biologica*, 26(1), s.34–41.
- Gontarek, R. R., McNally, M. T. & Beemon, K., 1993. Mutation of an RSV intronic element abolishes both U11/U12 snRNP binding and negative regulation of splicing. *Genes and Development*, 7(10), s.1926–1936.
- Gorman, C. M., Merlino, G. T., Willingham, M. C., Pastan, I. & Howard, B. H., 1982. The Rous sarcoma virus long terminal repeat is a strong promoter when introduced into a variety of eukaryotic cells by DNA-mediated transfection. *Biochemistry*, 79(22), s.6777–6781.
- Haddrath, O. & Baker, A. J., 2001. Complete mitochondrial DNA genome sequences of extinct birds: ratite phylogenetics and the vicariance biogeography hypothesis. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 268(1470), s.939–945.
- Haseltine, W. A., Maxam, A. M. & Gilbert, W., 1977. Rous sarcoma virus genome is terminally redundant: the 5' sequence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74(3), s.989–93.
- Himly, M., Foster, D. N., Bottoli, I., Iacovoni, J. S. & Vogt, P. K., 1998. The DF-1 chicken fibroblast cell line: Transformation induced by diverse oncogenes and cell death resulting from infection by avian leukemia viruses. *Virology*, 248(2), s.295–304.
- Hložánek, I., Donner, L. & Svoboda, J., 1966. Malignant transformation in vitro of chinese hamster embryonic fibroblasts with the Schmidt-Ruppin strain of Rous sarcoma virus and karyological analysis of this process. *Journal of Cellular Physiology*, 68(3), s.221–235.
- Hložánek, I., Dostálová, V., Rynditch, A. V & Geryk, J., 1992. Biology of Rous sarcoma virus adapted for replication and transformation of duck cells. *Folia biologica*, 38(1), s.48–56.
- Hložánek, I., Svoboda, J., Dostálová, V. & Mach, O., 1979. The Influence of Host Adaptation of Rous Sarcoma Virus on the Transfecting Activity of its DNA Provirus. *Journal of General Virology*, 45(1), s.139–147.
- Hodgson, C. P., Arora, P. & Fisk, R. Z., 1987. Nucleotide sequence of the long terminal repeat of the avian retrovirus RAV-1: evolution of avian retroviruses. *Nucleic acids research*, 15(5), s.2393.
- Hu, S. F., Lai, M. M. & Vogt, P. K., 1978. Characterization of the env gene in avian oncoviruses by heteroduplex mapping. *Journal of virology*, 27(3), s.667–676.
- Huang, Y., Li, Y., Burt, D. W., Chen, H., Zhang, Y., Li, N., *et al.*, 2013. The duck genome and transcriptome provide insight into an avian influenza virus reservoir species. *Nature genetics*, 45(7), s.776–783.
- Hughes, S. H., 2004. The RCAS vector system. *Folia biologica*, 50(3–4), s.107–19.

- Chowdhury, S., Kitamura, K., Simadu, M., Koura, M. & Muramatsu, M., 2013. Concerted action of activation-induced cytidine deaminase and uracil-DNA glycosylase reduces covalently closed circular DNA of duck hepatitis B virus. *FEBS Letters*, 587(18), s.3148–3152.
- ICTV, 2016. ICTV master species list 2015 v1. Available at: <https://talk.ictvonline.org/files/master-species-lists/m/msl/5945> [Viděno leden 31, 2017].
- Jacks, T., Madhani, H. D., Masiarz, F. R. & Varmus, H. E., 1988. Signals for ribosomal frameshifting in the Rous sarcoma virus gag-pol region. *Cell*, 55(3), s.447–458.
- Jacks, T. & Varmus, H. E., 1985. Expression of the Rous sarcoma virus pol gene by ribosomal frameshifting. *Science (New York, N. Y.)*, 230(4731), s.1237–1242.
- Kashuba, V. I., Kavsan, V. M., Ryndich, A. V., Lazurkevich, Z. V., Zubak, S. V., Popov, S. V., Dostálová, V. & Hložánek, I., 1993. [Complete nucleotide sequence of Rous sarcoma virus variants adapted to duck cells]. *Mol Biol (Mosk)*, 27(0026–8984 (Print)), s.436–450.
- Katz, R. A. & Skalka, A. M., 1988. A C-terminal domain in the avian sarcoma-leukosis virus pol gene product is not essential for viral replication. *Journal of virology*, 62(2), s.528–533.
- Katz, R. A. & Skalka, A. M., 1990. Control of retroviral RNA splicing through maintenance of suboptimal processing signals. *Molecular and cellular biology*, 10(2), s.696–704.
- Kingston, R. L., Olson, N. H. & Vogt, V. M., 2001. The organization of mature Rous sarcoma virus as studied by cryoelectron microscopy. *Journal of structural biology*, 136(1), s.67–80.
- Levinson, A. D., Oppermann, H., Levintow, L., Varmus, H. E. & Bishop, J. M., 1978. Evidence that the transforming gene of avian sarcoma virus encodes a protein kinase associated with a phosphoprotein. *Cell*, 15(2), s.561–572.
- Litzkas, P., Jha, K. K. & Ozer, H. L., 1984. Efficient transfer of cloned DNA into human diploid cells: protoplast fusion in suspension. *Molecular and cellular biology*, 4(11), s.2549–2552.
- Lounková, A., Dráberová, E., Šenigl, F., Trejbalová, K., Geryk, J., Hejnar, J. & Svoboda, J., 2014. Molecular events accompanying Rous sarcoma virus rescue from rodent cells and the role of viral gene complementation. *Journal of virology*, 88(6), s.3505–3515.
- Maciolek, N. L. & McNally, M. T., 2007. Serine/arginine-rich proteins contribute to negative regulator of splicing element-stimulated polyadenylation in rous sarcoma virus. *Journal of virology*, 81(20), s.11208–11217.
- Martin, G. S., 2001. The hunting of the Src. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 2(6), s.467–475.
- McClure, M. O. & Schulz, T. F., 1989. Origin of HIV. *British medical journal*, 298(6683), s.1267–1268.
- McNally, L. M. & McNally, M. T., 1999. U1 small nuclear ribonucleoprotein and splicing inhibition by the Rous sarcoma virus negative regulator of splicing element. *Journal of virology*, 73(3), s.2385–2393.
- McNally, M. T. & Beemon, K., 1992. Intronic sequences and 3' splice sites control Rous sarcoma virus RNA splicing. *Journal of virology*, 66(1), s.6–11.
- McNally, M. T., Gontarek, R. R. & Beemon, K., 1991. Characterization of Rous sarcoma virus intronic sequences that negatively regulate splicing. *Virology*, 185(1), s.99–108.

- Moelling, K., Scott, A., Dittmar, K. E. & Owada, M., 1980. Effect of p15-associated protease from an avian RNA tumor virus on avian virus-specific polypeptide precursors. *Journal of virology*, 33(2), s.680–688.
- Mothes, W., Boerger, A. L., Narayan, S., Cunningham, J. M. & Young, J. A.T., 2000. Retroviral entry mediated by receptor priming and low pH triggering of an envelope glycoprotein. *Cell*, 103(4), s.679–689.
- Motta, J. V, Crittenden, L. B. & Pollard, W. O., 1973. The inheritance of resistance to subgroup C leukosis-sarcoma viruses in New Hampshire chickens. *Poultry Science*, 52(2), s.578–586.
- Munguia, A. & Federspiel, M. J., 2008. Efficient subgroup C avian sarcoma and leukosis virus receptor activity requires the IgV domain of the Tvc receptor and proper display on the cell membrane. *Journal of Virology*, 82(22), s.11419–11428.
- Murphy, H. M., 1977. A new replication-defective variant of the Bryan high-titer strain Rous sarcoma virus. *Virology*, 77(2), s.705–721.
- Murphy, J. B. & Rous, P., 1912. The behavior of chicken sarcoma implanted in the developing embryo. *The Journal of experimental medicine*, 15(2), s.119–132.
- Nikolić, E. I.C., King, L. M., Vidakovic, M., Irigoyen, N. & Brierley, I., 2012. Modulation of ribosomal frameshifting frequency and its effect on the replication of Rous sarcoma virus. *Journal of Virology*, 86(21), s.11581–11594.
- Ogert, R. A., Lee, L. H. & Beemon, K. L., 1996. Avian retroviral RNA element promotes unspliced RNA accumulation in the cytoplasm. *Journal of virology*, 70(6), s.3834–3843.
- Ogg, S. L., Weldon, A. K., Dobbie, L., Smith, A. J.H. & Mather, I. H., 2004. Expression of butyrophilin (Btln1a1) in lactating mammary gland is essential for the regulated secretion of milk-lipid droplets. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(27), s.10084–10089.
- Parker, R. C., Varmus, H. E. & Bishop, J. M., 1981. Cellular homologue (c-src) of the transforming gene of Rous sarcoma virus: isolation, mapping, and transcriptional analysis of c-src and flanking regions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 78(9), s.5842–5846.
- Payne, L. N., 1987. Epizootiology of avian leukosis virus infections. In G. F. De Boer, ed. *Avian leukosis*. Boston, MA: Springer US, s. 47–75.
- Payne, L. N. & Biggs, P. M., 1970. Genetic resistance of fowl to MH2 reticuloendothelioma virus. *Journal of General Virology*, 7(3), s.177–185.
- Payne, L. N. & Bumstead, N., 1982. Theoretical considerations on the relative importance of vertical and horizontal transmission for the maintenance of infection by exogenous avian lymphoid leukosis virus. *Avian Pathology*, 11(4), s.547–553.
- Payne, L. N., Howes, K., Gillespie, A. M. & Smith, L. M., 1992. Host range of Rous sarcoma virus pseudotype RSV(HPRS-103) in 12 avian species: Support for a new avian retrovirus envelope subgroup, designated J. *Journal of General Virology*, 73(11), s.2995–2997.
- Plachý, J., Kotáb, J., Divina, P., Reinišová, M., Šenigl, F. & Hejnar, J., 2010. Proviruses selected for high and stable expression of transduced genes accumulate in broadly transcribed genome areas. *Journal of Virology*, 84(9), s.4204–4211.

- Plachý, J., Reinišová, M., Kučerová, D., Šenigl, F., Stepanets, V., Hron, T., Trejbalová, K., Elleder, D. & Hejnar, J., 2017. Identification of New World quails susceptible to infection with avian leukosis virus subgroup J S. R. Ross, ed. *Journal of Virology*, 91(3), s.e02002-16.
- Purdy, W. J., 1932. The propagation of the Rous Sarcoma no. 1 in ducklings. *British journal of experimental pathology*, 13(6), s.473–479.
- Rainey, G. J.A., Natonson, A., Maxfield, L. F. & Coffin, J. M., 2003. Mechanisms of avian retroviral host range extension. *Journal of virology*, 77(12), s.6709–6719.
- Robinson, H. L., Astrin, S. M., Senior, A. M. & Salazar, F. H., 1981. Host Susceptibility to endogenous viruses: defective, glycoprotein-expressing proviruses interfere with infections. *Journal of virology*, 40(3), s.745–751.
- Rous, P., 1911. A sarcoma of the fowl transmissible by an agent separable from the tumor cells. *The Journal of Experimental Medicine*, 13(4), s.397–411.
- Rous, P., 1910. A transmissible avian neoplasm. (Sarcoma of the common fowl.). *The Journal of Experimental Medicine*, 12(5), s.696–705.
- Rushlow, K. E., Lautenberger, J. A., Papas, T. S., Baluda, M. A., Perbal, B., Chirikjian, J. G. & Reddy, E. P., 1982. Nucleotide sequence of the transforming gene of avian myeloblastosis virus. *Science (New York, N. Y.)*, 216(4553), s.1421–1423.
- Sawyer, R. C., Harada, F. & Dahlberg, J. E., 1974. Virion-associated RNA primer for Rous sarcoma virus DNA synthesis: isolation from uninfected cells. *Journal of virology*, 13(6), s.1302–1311.
- Searle, S., Gillespie, D. A.F., Chiswell, D. J. & Wyke, J. A., 1984. Analysis of the variations in proviral cytosine methylation that accompany transformation and morphological reversion in a line of Rous sarcoma virus-infected Rat-1 cells. *Nucleic acids research*, 12(13), s.5193–5210.
- Shimakage, M. I., Kamahora, T., Hakura, A. & Toyoshima, K., 1979. Selective replication of transformation-defective avian aarcoma virus mutants in duck embryo fibroblasts. *Journal of General Virology*, 45(1), s.99–105.
- Shoyab, M. & Baluda, M. A., 1975. Homology between avian oncornavirus RNAs and DNA from several avian species. *Journal of virology*, 16(6), s.1492–1502.
- Schultz, U. & Chisari, F. V, 1999. Recombinant duck interferon gamma inhibits duck hepatitis B virus replication in primary hepatocytes. *Journal of virology*, 73(4), s.3162–3168.
- Schwartz, D. E., Tizard, R. & Gilbert, W., 1983. Nucleotide sequence of Rous sarcoma virus. *Cell*, 32(3), s.853–869.
- Schwartz, D. E., Zamecnik, P. C. & Weith, H. L., 1977. Rous sarcoma virus genome is terminally redundant: the 3' sequence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74(3), s.994–998.
- Simpson, S. B., Guo, W., Winistorfer, S. C., Craven, R. C. & Stoltzfus, C. M., 1998. The upstream direct repeat sequence of Prague A Rous sarcoma virus is deficient in mediating efficient Gag assembly and particle release. *Virology*, 247(1), s.86–96.

- Simpson, S. B. & Stoltzfus, C. M., 1994. Frameshift mutations in the v-src gene of avian sarcoma virus act in cis to specifically reduce v-src mRNA levels. *Molecular and cellular biology*, 14(3), s.1835–1844.
- Simpson, S. B., Zhang, L., Craven, R. C. & Stoltzfus, C. M., 1997. Rous sarcoma virus direct repeat cis elements exert effects at several points in the virus life cycle. *Journal of virology*, 71(12), s.9150–9156.
- Sorge, J., Ricci, W. & Hughes, S. H., 1983. cis-Acting RNA packaging locus in the 115-nucleotide direct repeat of Rous sarcoma virus. *Journal of virology*, 48(3), s.667–675.
- Stewart, L., Schatz, G. & Vogt, V. M., 1990. Properties of avian retrovirus particles defective in viral protease. *Journal of virology*, 64(10), s.5076–5092.
- Stewart, L. & Vogt, V. M., 1991. trans-acting viral protease is necessary and sufficient for activation of avian leukemia virus reverse transcriptase. *Journal of virology*, 65(11), s.6218–6231.
- Stoltzfus, C. M., Dimock, K., Horikami, S. & Ficht, T. A., 1983. Stabilities of avian sarcoma virus RNAs: Comparison of subgenomic and genomic species with cellular mRNAs. *Journal of General Virology*, 64(10), s.2191–2202.
- Stoltzfus, C. M. & Kuhnert, L. K., 1979. Evidence for the identity of shared 5'-terminal sequences between genome RNA and subgenomic mRNA's of B77 avian sarcoma virus. *Journal of virology*, 32(2), s.536–545.
- Svoboda, J., 2016. On board a raft or boat in the retrovirus sea. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(15), s.3927–3931.
- Svoboda, J., 2003. Postulation of and evidence for provirus existence in RSV-transformed cells and for an oncogenic activity associated with only part of the RSV genome. *Gene*, 317(1–2), s.209–213.
- Svoboda, J., 1960. Presence of chicken tumour virus in the sarcoma of the adult rat inoculated after birth with Rous sarcoma tissue. *Nature*, 186, s.980–981.
- Svoboda, J. & Dourmashkin, R., 1969. Rescue of Rous sarcoma virus from virogenic mammalian cells associated with chicken cells and treated with Sendai virus. *The Journal of general virology*, 4(4), s.523–529.
- Svoboda, J., Geryk, J. & Karakoz, I., 1980. Long-term persistence of transformation-defective mutants of subgroup C in chickens and ducks inoculated early in life. *Archiv für Geschwulstforschung*, 50(5), s.429–434.
- Svoboda, J., Chýle, P., Šimkovič, D. & Hilgert, I., 1963. Demonstration of the absence of infectious Rous virus in rat tumour XC, whose structurally intact cells produce Rous sarcoma when transferred to chicks. *Folia biologica*, 9, s.77–81.
- Svoboda, J., Machala, O. & Hložánek, I., 1967. Influence of Sendai virus on RSV formation in mixed culture of virogenic mammalian cells and chicken fibroblasts. *Folia Biol (Praba)*, 13(2), s.155–157.
- Šenigl, F., Auxt, M. & Hejnar, J., 2012. Transcriptional provirus silencing as a crosstalk of de novo DNA methylation and epigenomic features at the integration site. *Nucleic Acids Research*, 40(12), s.5298–5312.
- Telesnitsky, A. & Goff, S. P., 1997. Reverse transcriptase and the generation of retroviral DNA. In J. M. Coffin, S. H. Hughes, & H. E. Varmus, ed. *Retroviruses*. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press.

- The UniProt Consortium, 2017. UniProt: the universal protein knowledgebase. *Nucleic Acids Research*, 45(D1), s.D158–D169.
- Varmus, H. E., Bishop, J. M. & Vogt, P. K., 1973. Appearance of virus-specific DNA in mammalian cells following transformation by Rous sarcoma virus. *Journal of molecular biology*, 74(4), s.613–626.
- Varmus, H. E., Vogt, P. K. & Bishop, J. M., 1973. Integration of deoxyribonucleic acid specific for Rous sarcoma virus after infection of permissive and nonpermissive hosts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 70(11), s.3067–3071.
- Verderame, M. F., Nelle, T. D. & Wills, J. W., 1996. The membrane-binding domain of the Rous sarcoma virus Gag protein. *Journal of virology*, 70(4), s.2664–2668.
- Vogt, P. K., 1977. Genetics of RNA tumor viruses. In H. Fraenkel-Conrat & R. R. Wagner, ed. *Regulation and Genetics*. Boston, MA: Springer US, s. 341–455.
- Vogt, P. K., 1997. Historical introduction to the general properties of retroviruses. In J. M. Coffin, S. H. Hughes, & H. E. Varmus, ed. *Retroviruses*. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Vogt, P. K., 1971. Spontaneous segregation of nontransforming viruses from cloned sarcoma viruses. *Virology*, 46(3), s.939–946.
- Weiss, R. A., 1993. Cellular receptors and viral glycoproteins involved in retrovirus entry. In J. A. Levy, ed. *The Retroviridae*. Springer Science & Business Media New York.
- Weiss, R. A., Mason, W. S. & Vogt, P. K., 1973. Genetic recombinants and heterozygotes derived from endogenous and exogenous avian RNA tumor viruses. *Virology*, 52(2), s.535–552.
- Wilusz, J. E. & Beemon, K. L., 2006. The negative regulator of splicing element of Rous sarcoma virus promotes polyadenylation. *Journal of Virology*, 80(19), s.9634–9640.
- Yamamoto, T., de Crombrughe, B. & Pastan, I., 1980. Identification of a functional promoter in the long terminal repeat of Rous sarcoma virus. *Cell*, 22(3), s.787–797.
- Yee, J. K., Friedmann, T. & Burns, J. C., 1994. Generation of high-titer pseudotyped retroviral vectors with very broad host range. *Methods in cell biology*, 43 Pt A, s.99–112.
- Zarling, D. A. & Temin, H. M., 1975. High spontaneous mutation rate of an avian sarcoma virus. *Journal of virology*, 17(1), s.74–84.
- Zhang, L., Simpson, S. B. & Stoltzfus, C. M., 1996. Selection and characterization of replication-competent revertants of a Rous sarcoma virus src gene oversplicing mutant. *Journal of virology*, 70(6), s.3636–3644.
- Zhang, L. & Stoltzfus, C. M., 1995. A suboptimal src 3' splice site is necessary for efficient replication of Rous sarcoma virus. *Virology*, 206(2), s.1099–1107.
- Zheng, Y.-H., Jeang, K.-T. & Tokunaga, K., 2012. Host restriction factors in retroviral infection: promises in virus-host interaction. *Retrovirology*, 9(1), s.112–139.